



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Determinación en condiciones semi-naturales de las interacciones tróficas de *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), depredador de mosca blanca

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Lourdes Bao Fundora

Zapopan, Jalisco

octubre de 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Determinación en condiciones semi-naturales
de las interacciones tróficas de *Geocoris
punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), depredador
de mosca blanca**

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Lourdes Bao Fundora

Zapopan, Jalisco

octubre de 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Determinación en condiciones semi-naturales de las interacciones tróficas de *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae), depredador de mosca blanca.

Por

Lourdes Bao Fundora

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



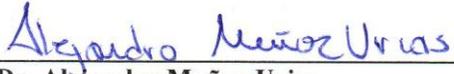
Dr. Ricardo Ramírez Romero
Director de Tesis e integrante del jurado

09/10/15
Fecha



Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
Asesor del Comité Particular

09/10/15
Fecha



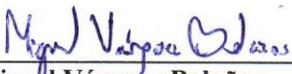
Dr. Alejandro Muñoz Urias
Integrante del jurado

13/10/15
Fecha



Dr. Eduardo Ríos Jara
Integrante del jurado

12/10/15
Fecha



Dr. Miguel Vázquez Bolaños
Integrante del jurado

14/10/2015
Fecha

Agradecimientos:

Se agradece al Gobierno de México, por permitir mi legal estancia en su territorio para la realización de esta tesis.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo financiero al proyecto No. 0157259 del programa de Ciencia Básica otorgado al Dr. Ricardo Ramírez Romero.

A las empresas productoras de organismos benéficos: Koppert México y Organismos Benéficos para la Agricultura S.A. de C.V., por su apoyo en la donación de las avispa parasitoides y las chinches respectivamente.

A la coordinación de la Maestría BIMARENA (Juri y Dra Paty), por la eficiencia y calidad en su trabajo de apoyo a los estudiantes de forma incondicional.

A los profesores que durante mi estancia en el posgrado me hicieron crecer académicamente con clases de excelencia: Pablo Torres Morán, Mónica Riojas, Alma Rosa Villalobos, Marta Escoto y Roger Guevara.

A mis sinodales: Dr. Eduardo Ríos Jara, Dr. Alejandro Muñoz Urias, Dr. Miguel Vasquez Bolaños, por su colaboración en la revisión del documento de tesis.

A mis amigos moleculeros porque los momentos en el laboratorio fueron agradables y divertidos (Samuel, Uriel, Fercha, Alejandro, Paulina, Isabel, Efrain, Ana Karen). En especial a Fercha por aclarar siempre mis dudas.

A los muchachos del laboratorio de control biológico, gracias por enseñarme de los insectos y de la vida en México (Fany, Conchita, Delia, Luis, Adal, Kike, Daniela, Pau, Walter, Héctor).

En especial a Fany, Conchita y Delia!! Gracias, por esos momentos de ciencia, de diversión, de intercambio, siempre me sentí como en mi casa gracias a ustedes.

Agradezco a mi gran familia mexicana de Jamay y de Guadalajara el apoyo en todo momento y a mi familia cubana por entender que este era un paso importante en mi vida, en especial a mi mamá, Conri, Lesvia, Yander, Carlos A., Gaby y a mi hermano, por su apoyo financiero incondicional.

A la persona más especial del mundo! Gracias Ramón por entender mis interminables noches y fines de semana en el laboratorio y por apoyarme y hacerme feliz en todo momento. Sin ti, no hubiera avanzado tanto como persona, en el plano científico y personal.

Por último a dos personas muy importantes: Dra. Carla Sánchez y Ricardo Ramírez, por su apoyo incondicional para la realización de la tesis. En especial a Ricardo porque nunca dudó de mí.

RESUMEN

La chinche *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Lygaeidae) es un depredador de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) (MB), puede establecer interacciones tróficas con otras plagas e incluso con organismos benéficos como la avispa parasitoide *Eretmocerus eremicus* Rose y Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae), desarrollando con esta última, una interacción conocida como depredación intragremial (DIG). Estas evidencias se han obtenido en condiciones de laboratorio, donde los individuos están confinados a pequeños espacios; por lo que nuestra hipótesis es que en condiciones semi-naturales el depredador *G. punctipes* no establece interacciones tróficas con otros insectos herbívoros (pulgón *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae)), ni con otro enemigo natural (*E. eremicus*), sino sólo con la mosca blanca *T. vaporariorum*. Para demostrarla, se desarrollaron dos bioensayos en plantas de jitomate *Solanum lycopersicum* cv. "Saladette" encerradas en microcosmos. El bioensayo 1, consistió en la introducción de la chinche, la avispa y las ninfas de mosca blanca en los microcosmos, sin la presencia de la presa alternativa (pulgón) y luego de 48 horas de interacción, se colectaron las chinches para la evaluación molecular (confirmar DIG) y revisión de las siguientes variables: número de ninfas depredadas, número de ninfas parasitadas, número de moscas y avispas emergidas. En el bioensayo 2 se adicionó la presa alternativa *Myzus persicae* y se evaluaron las variables anteriores. Los resultados muestran que *G. punctipes* ejerce DIG sobre *E. eremicus* (adultos e inmaduros) en condiciones semi-naturales, lo que se confirma con porcentajes de detección molecular superiores al 90%. Además se observó que en los tratamientos donde ambos depredadores coexistieron, se elevó el consumo de ninfas de mosca blanca (50% detección molecular). Al mismo tiempo, se encontró mediante observaciones directas que el número de moscas blancas fue significativamente menor en los tratamientos donde ambos enemigos naturales estaban presentes, en comparación con los tratamientos donde actuaron solos. En cuanto a la adición de una presa alternativa, esta no provocó la disrupción del control biológico de la mosca blanca y siguió existiendo depredación intragremial, aunque menos que cuando no existía presa alternativa. Lo anterior indica que a pesar de existir DIG, su existencia no afecta el control sobre mosca blanca, por lo que el uso conjunto de estos dos enemigos naturales para control de MB parece factible, aunque otras pruebas son necesarias para su validación.

ABSTRACT

The big-eyed bug *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Lygaeidae) is a predator of whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) (MB), but it can set trophic interactions with other pests and even biocontrol agents such as the parasitic wasp *Eretmocerus eremicus* Rose y Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae). It is establishing with the latter an interaction known as intraguild predation (DIG). These evidences were obtained in laboratory conditions where individuals were confined to small spaces, so, our hypothesis is that in semi-natural conditions the predator *G. punctipes* does not set trophic interactions with other herbivorous insects (aphids *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae)) or with another natural enemy (*E. eremicus*), but only with the whitefly *T. vaporariorum*. The hypothesis was demonstrated by two bioassays. These ones were developed on *Solanum lycopersicum* tomato plants cv. Saladette enclosed in microcosm. The bioassay 1 consisted in the introduction of the big eyed bug and the wasp in the microcosm, without the presence of alternative prey (aphids) and after 48 hours of interaction, big-eyed bugs were collected for molecular assessment (confirm DIG). It also was evaluated the number of preyed nymphs, number of parasitized nymphs, number of flies and wasps emerged. In the second bioassay, the alternative prey, *Myzus persicae* was introduced in the microcosm, and the above variables were evaluated. The results shown that *G. punctipes* established DIG on *E. eremicus* (adult and immature) in semi-natural conditions, which is confirmed by molecular detection rates of over 90%. It also was noted that in treatments where both predators coexisted, the detection of whitefly nymphs was also possible (50% molecular detection). At the same time, it was found that the number of whiteflies was significantly lower in treatments where both natural enemies were present, compared with the treatments where they acted alone. When an alternative prey was present, did not occurred the disruption of biological control of whiteflies and predation intragremial continued to exist, though less than when there was no alternative prey. This indicates that although there DIG, its existence does not affect the control of whiteflies, so the set of these two natural enemies to control the MB seems feasible, although further experiments are necessary for validation.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE ANEXOS.....	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 POBLACIONES DEL ESTUDIO.....	3
2.1.1 <i>El jitomate</i>	3
2.1.2 <i>Mosca blanca Trialeurodes vaporariorum</i>	3
2.1.3 <i>El pulgón Myzus persicae Sulzer</i>	5
2.1.4 ENEMIGOS NATURALES.....	5
2.1.4.1 <i>El parasitoide Eretmocerus eremicus</i>	5
2.1.4.2 <i>Depredador Geocoris punctipes</i>	6
2.2 INTERACCIONES TRÓFICAS. DEFINICIONES ECOLÓGICAS.....	6
2.2.1 <i>Depredación intragremial: Definición y características principales</i>	7
2.2.2 <i>Depredación intragremial sobre insectos parasitoides</i>	10
2.2.3 <i>Implicaciones de la depredación intragremial en el control biológico</i>	11
2.2.4 <i>Escenarios semi-naturales y naturales donde ocurre DIG</i>	12
2.2.5 <i>Las presas alternativas</i>	14
2.3 METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES TRÓFICAS ENTRE INDIVIDUOS.....	15
2.3.1 ANÁLISIS BASADOS EN EL ADN MEDIANTE PCR.....	15
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 PLANTAS.....	18
5.2 INSECTOS PLAGA DEL ESTUDIO.....	19
5.2.1 <i>Mosca blanca T. vaporariorum</i>	19
5.2.2 <i>Pulgón Myzus persicae</i>	19
5.3 ENEMIGOS NATURALES.....	20
5.3.1 <i>Avispa parasitoide Eretmocerus eremicus</i>	20
5.3.2 <i>Chinche depredadora Geocoris punctipes</i>	21
5.4 EFECTO DE LA DEPREDACIÓN DE <i>G. PUNCTIPES</i> SOBRE LAS POBLACIONES DE MOSCA BLANCA Y AVISPA PARASITOIDE EN LOS MICROCOSMOS.....	21
5.4.1 SIN PRESA ALTERNATIVA.....	21
5.4.1.1 <i>Diseño experimental y variables de respuesta</i>	23
5.4.2 CON PRESA ALTERNATIVA.....	25
5.4.2.1 <i>Diseño experimental y variables de respuesta</i>	28
5.5 ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS INDIVIDUOS DE <i>G. PUNCTIPES</i> COLECTADOS DE LA RED TRÓFICA MÁS SIMPLE (BIOENSAYO 1, SIN PRESA ALTERNATIVA).....	30
5.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	30
5.5.2 ANÁLISIS POR PCR:.....	31
5.5.3 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DEL CEBADOR.....	32
6. RESULTADOS.....	32
6.1 EFECTO DE LA DEPREDACIÓN DE <i>G. PUNCTIPES</i> EN LAS POBLACIONES DE MOSCA BLANCA Y AVISPA PARASITOIDE EN MICROCOSMOS.....	32
6.1.1 <i>Sin presa alternativa</i>	32
6.1.2 <i>Con presa alternativa</i>	36

6.2 ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS INDIVIDUOS DE <i>G. PUNCTIPES</i> COLECTADOS DEL BIOENSAYO 1 PARA LA DETECCIÓN DE LAS INTERACCIONES TRÓFICAS	41
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES.....	50
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
10. ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microcosmo de mica y organza con soporte de hule en la base.....	22
Figura 2. Posibles relaciones tróficas entre los individuos ubicados en cada bioensayo.....	26
Figura 3. Número promedio de ninfas consumidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos, sin presa alternativa.....	33
Figura 4. Número promedio de moscas emergidas en los microcosmos, sin presa alternativa.....	34
Figura 5. Número promedio de ninfas parasitadas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos.....	35
Figura 6. Número promedio de avispas emergidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos, sin presa alternativa.....	36
Figura 7. Número promedio de ninfas de mosca blanca consumidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos, con presa alternativa.....	37
Figura 8. Número promedio de moscas emergidas en los microcosmos, con presa alternativa.....	38
Figura 9. Número promedio de pulgones encontrados y no encontrados en los microcosmos.....	39
Figura 10. Número promedio de ninfas parasitadas en los tratamientos con los enemigos naturales en los microcosmos bioensayo 2.....	40
Figura 11. Número promedio de avispas emergidas en los tratamientos con la presencia de los enemigos naturales en los microcosmos, con presa alternativa.....	41
Figura 12: Productos de amplificación usando los cebadores para detectar el mínimo número de presas (<i>E. eremicus</i> (A) or <i>T. vaporariorum</i> (B)) que puede ser detectado en el tracto digestivo de <i>G. punctipes</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cebador diseñado para detectar ADN de la avispa <i>Eretmocerus eremicus</i> y la mosca <i>T. vaporariorum</i> en el tracto digestivo del depredador <i>Geocoris punctipes</i>	31
TABLA 2. Porcentaje de detección molecular de <i>E. eremicus</i> y <i>T. vaporariorum</i> en el tracto digestivo de <i>G. punctipes</i>	42
TABLA 3. Número de individuos del total de individuos analizados que resultaron positivos en la detección de ADN después de cada tiempo de consumo.....	64

ÍNDICE DE ANEXOS:

Anexo 1: Manuscrito aceptado y publicado en la revista: Pest Managment Science. (Factor de impacto: 2.694)60

Anexo 2: Experimento preliminar para determinar el número mínimo de presas que se pueden detectar por análisis de PCR en el tracto digestivo del depredador *G. punctipes*.....61

Anexo 3: Experimento preliminar para determinar el tiempo en que permanece el ADN de la presa en el tracto digestivo del depredador.....63

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NMB.....Ninfas de mosca blanca

MB.....Mosca blanca

G.....Chinche depredadora *Geocoris punctipes*

A.....Avispa parasitoide *Eretmocerus eremicus*

DIG.....Depredación intragremial

Sim.....simultáneo

Sec.....secuencial

ADN.....ácido desoxirribonucleico

PCR..... reacción en cadena de la polimerasa

COI I.....citocromo oxidasa I

COI II.....citocromo oxidasa II

**ITS-1.....región espaciadora del precursor del ácido
ribonucleico**

1. Introducción

En la naturaleza la relación trófica entre un enemigo natural y su presa primaria no es necesariamente una relación simple y directa (Vet y Godfray, 2008), sino que existen complejas redes alimentarias, donde ocurren eventos combinados de competencia y depredación (Polis y Strong, 1996). En términos ecológicos, cuando se combinan eventos de depredación y competencia ocurre un fenómeno conocido como depredación intragremial (DIG). Según Polis *et al.* (1989) este evento ocurre cuando las especies que compiten por un recurso en común se atacan entre sí.

La DIG se ha evaluado entre diferentes enemigos naturales en condiciones de laboratorio (Malo *et al.*, 2012), pero también en condiciones semi-naturales (Montemayor y Cave, 2012) y naturales (Heimpel *et al.*, 1997). Los estudios en condiciones semi-naturales y naturales son escasos, o tienen limitada evidencia experimental y observacional. Los métodos de estudio de la DIG fuera del laboratorio, requieren de mucho tiempo y esfuerzo, cuando se basan sólo en metodologías como las observaciones directas. De ahí que estos estudios se complementen con técnicas moleculares que permitan determinar el contenido del tubo digestivo del depredador y evaluar qué presa consumió realmente (Agustí *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2011), por lo que estas técnicas, sobre todo las basadas en el análisis de ADN por PCR, son una herramienta importante para estudiar complejas relaciones tróficas en condiciones de campo (Sheppard y Harwood, 2005; Aebi *et al.*, 2011).

No obstante, las investigaciones en el laboratorio también son valiosas, porque permiten el primer acercamiento a las interacciones tróficas de un depredador en un ambiente controlado. Velasco-Hernández *et al.* (2013) por ejemplo, detectaron la presencia de depredación intragremial de la chinche *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Lygaeidae) sobre el parasitoide *Eretmocerus eremicus* Rose y Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae). Ambos son enemigos naturales de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), que pueden coincidir en el cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Sin embargo, en condiciones semi-naturales no se conoce si existe este tipo de interacción y qué efectos puede tener en el control de esta plaga.

Además, la mosca blanca puede coincidir en invernaderos de jitomate con otras plagas como trips, minadores y pulgones (Arnó *et al.*, 1994). En este caso, si se adiciona un depredador generalista a la red trófica, como *Macrolophus caliginosus* Wagner (Hemiptera: Miridae), este puede establecer interacciones tróficas con la mosca blanca y con otras presas alternativas en el sistema, ya que según Rosenheim y Harmon (2010), los sistemas en la naturaleza son abiertos y si el depredador tiene una amplia dieta, entonces es probable que consuma múltiples especies de herbívoros y también recursos derivados de la planta.

El consumo de otras especies de presas alternativas a la presa primaria, puede provocar una disrupción del control biológico de la plaga focal, debido a las diferentes densidades entre la presa alternativa y la plaga, o debido a las preferencias alimentarias del depredador por una de ellas (Koss y Snyder, 2005). Sin embargo, en un contexto de depredación intragremial las presas alternativas pueden provocar una disminución de esta interacción entre los enemigos naturales. Por ejemplo, Pérez–Ascencio (2014) describió una disminución de la DIG, en presencia de una presa alternativa, el pulgón *Myzus persicae*. No obstante los experimentos en el laboratorio, tampoco se ha evaluado el efecto de una presa alternativa en estas interacciones tróficas en condiciones semi-naturales o naturales.

A pesar de las características de los depredadores generalistas y su capacidad de consumir gran variedad de presas, en condiciones semi-naturales o naturales las presas tienen mayor posibilidad de escapar, por lo que la magnitud y simetría de la DIG varía en los distintos ecosistemas. En algunos casos, depende de la abundancia de la presa extragremial (Lucas y Rosenheim, 2011) y en otros casos influyen factores como: la estructura del hábitat (Malo *et al.*, 2012), la talla corporal (Lucas *et al.*, 1998), la disponibilidad de presas alternativas (Koss *et al.*, 2004) y las defensas que presenta la presa (Guershon y Gerling, 1999).

De forma general, el conocimiento de estas relaciones tróficas en los agrosistemas es importante, pues puede contribuir a entender de mejor manera la forma de acción de los enemigos naturales (Moreno-Ripoll *et al.*, 2012). También puede ayudar a estimar el alcance del control biológico y contribuir con su optimización (Snyder e Ives, 2008).

2. Antecedentes

2.1 Poblaciones del estudio

2.1.1 El jitomate

El jitomate cultivado *Solanum lycopersicum* L. y 12 especies silvestres pertenecen a la Familia Solanaceae, sección Lycopersicon (Peralta *et al.*, 2006). Se postula que este cultivo es originario de la región andina, aunque dos subespecies son originarias de las Islas Galápagos (Bai y Lindhout, 2007). Es el producto hortícola de mayor importancia económica a nivel mundial (FAOSTAT, 2010). En México en 2010, hubo 9810 ha cultivadas con una producción neta que lo ubicaba como el décimo país exportador de este producto (FAOSTAT, 2010). Entre los estados con mayor producción destacan Coahuila, Morelos, Nuevo León, Querétaro y Jalisco, con un rendimiento superior a 50 ton/ha (SIAP-SAGARPA, 2013). El jitomate es afectado por muchas plagas entre ellas se destacan la mosca blanca y el pulgón, para lo cual se han utilizado diversos enemigos naturales (Arnó *et al.*, 1994; Moreno-Ripoll *et al.*, 2012).

2.1.2 Mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*

La familia Aleyrodidae cuenta con más de 1200 especies descritas. Dentro de ésta quizás, las especies más importantes como plagas de cultivos hortícolas son: *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) llamadas comúnmente “moscas blancas” (Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013).

Los representantes de esta familia son chupadores, originarios de América Central y del Sur (Gill, 1990; Byrne y Bellows, 1991) pero presentan distribución cosmopolita y *T. vaporariorum* es considerada una de las plagas polífagas que puede ocasionar más pérdidas en invernaderos (Soto *et al.*, 1999), debido fundamentalmente a la producción de secreciones azucaradas que favorecen la aparición de la fumagina (hongo), que dificulta el desarrollo fotosintético de la planta, aunque también se reconoce que puede ser transmisor de enfermedades virales (Cardona *et al.*, 2005).

La reproducción de *T. vaporariorum* es por arrenotokia y los huevos son piriformes-ovoides (Byrne y Bellows, 1991). Generalmente oviposita en círculos o semi-círculos en la superficie adaxial de la hoja. Los huevos se tornan negros cuando van a emerger (Carapia-

Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013). Es un insecto hemimetábolo que presenta cuatro estadios ninfales y de estos, solamente el primero es móvil (Byrne y Bellows, 1991). El ciclo de desarrollo desde el huevo hasta el adulto varía con la temperatura. Por ejemplo, a 24.26°C en plantas de jitomate en invernadero, se ha observado que el desarrollo se completa en aproximadamente 26.4 días (Soto *et al.*, 1999). De ahí que existan variaciones en la proliferación de moscas blancas en diferentes regiones, a diferentes temperaturas y en diferentes huéspedes (Azab *et al.*, 1971; Gameel, 1974; Greenberg *et al.*, 2002). Por ejemplo la mosca blanca *T. vaporariorum* se aclimata perfectamente a temperaturas de 18-22°C y HR de 60% (Cardona *et al.*, 2005) y el factor que más incide en la mortalidad son las fuertes lluvias que provocan desprendimientos de las ninfas y, por lo tanto, disminuyen los niveles de infestación (Naranjo *et al.*, 2004; Cardona *et al.*, 2005).

El adulto de *T. vaporariorum* presenta una longitud promedio de 0.9 ± 0.19 mm (Soto *et al.*, 1999), su cuerpo es de color amarillo pálido y las alas son blancas (Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013). Los adultos logran colonizar diversos cultivos en condiciones de invernadero como el frijol (Díaz *et al.*, 2012), el pepino (Castañé *et al.*, 2009), el tomate, la papa y la habichuela (Cardona *et al.*, 2005).

La dispersión de estos adultos es generalmente mediante corrientes de aire ya que son malos voladores y una vez que se establecen en un cultivo ocasionan enormes daños, por lo que se ha empleado el control químico, cultural y biológico para disminuir su proliferación. El control biológico se ha llevado a cabo con enemigos naturales que actúan como depredadores, principalmente algunas especies de los órdenes: Hemiptera, Coleoptera y Neuroptera; o con enemigos naturales que actúan como parasitoides principalmente del orden Hymenoptera y la familia Aphelinidae (Cardona *et al.*, 2005).

2.1.3 El pulgón *Myzus persicae* Sulzer

El pulgón *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) es transmisor de más de 100 enfermedades virales (Blackman y Eastop, 2011). Ataca varios cultivos, entre ellos el jitomate. Por ejemplo, en Brasil se ha detectado que la proliferación de las poblaciones de la plaga en el cultivo del jitomate ocurre en fases de desarrollo intermedias y finales del mismo. Los individuos atacan preferentemente la parte apical de la planta y por lo tanto casi no se encuentran individuos en la zona basal de la misma (Leite *et al.*, 2002).

En condiciones naturales las poblaciones de pulgones se pueden ver afectadas por la influencia de altas temperaturas y fuertes lluvias (Leite *et al.*, 2002). La duración de los estados ninfales varía con el aumento de la temperatura, entre 12.5 días y 5.5 días a temperaturas de 15 y 30°C, respectivamente. Una vez que los individuos se vuelven adultos, comienzan a reproducirse, con las mayores tasas de reproducción entre 15 y 20°C. En invernaderos, el periodo reproductivo inicia a los 7.5 días, con la producción promedio de 4.89 ninfas por día. La sobrevivencia comienza a disminuir a partir de los 11.5 días como promedio (Barbosa *et al.*, 2011).

2.1.4 Enemigos naturales

2.1.4.1 El parasitoide *Eretmocerus eremicus*

Las especies del género *Eretmocerus* están distribuidas mundialmente (Gerling *et al.*, 2001). Entre ellas se conoce a *Eretmocerus eremicus* Rose and Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae), que es un endoparasitoide solitario de ninfas de mosca blanca (Gerling, 1990; De Barro *et al.*, 2000). La oviposición la realiza en los diferentes estadios ninfales de la mosca blanca; pero prefiere el segundo y tercer estadio (Headrick *et al.* 1996). Los huevos eclosionan y la larva en primer estadio penetra en el cuerpo del huésped. La larva pasa por tres estadios y se alimenta de los fluidos internos del huésped (López-Ávila *et al.*, 2001).

El adulto emerge por un hueco que hace en la parte anterodorsal de la piel vacía del huésped, llegando a vivir 14 días, a temperaturas de 25°C en ninfas de *T. vaporariorum* (Soler y van Lenteren, 2004), mientras que el tiempo de desarrollo de los juveniles sobre este mismo huésped a la misma temperatura es aproximadamente 22 días (Greenberg *et al.*, 2002). Son sinovigénicos (Gerling *et al.*, 2001), las hembras producen entre 3-5 huevos

diariamente (Powell y Bellows, 1992), aunque esto también depende de la temperatura y del huésped.

Eretmocerus eremicus es uno de los parasitoides más comercializados para el control de la plaga en cultivos hortícolas (Badii y Abreu, 2006). Específicamente en el cultivo del jitomate resulta ser uno de los parasitoides más encontrados en el control de la mosca blanca (Gerling *et al.*, 2001).

2.1.4.2 Depredador *Geocoris punctipes*

La chinche ojona *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Lygaeidae) es una especie polífaga, depredadora de moscas blancas (López-Ávila *et al.*, 2001; Hagler *et al.*, 2004). La oviposición la realizan en diferentes partes de la planta (Naranjo, 1987). Los huevos de *G. punctipes* son subcilíndricos aproximadamente de 0.9 mm de largo (Champlain y Sholdt, 1967).

Esta chinche tiene un ciclo de vida que incluye cinco estadios ninfales que duran entre 23 y 36 días mientras que el individuo adulto puede llegar a vivir hasta 111 días (Champlain y Sholdt, 1967). Los adultos de esta especie se pueden aparear desde el tercer día que emergen (Marques *et al.*, 2000).

La conducta alimentaria de esta chinche incluye la depredación, fitofagia y necrofaagia, en condiciones naturales (Crocker y Withcomb, 1980). El canibalismo de sus huevos por parte de individuos adultos y ninfas se ha observado en experimentos de laboratorio (Cohen, 1985). Durante la depredación, los individuos atacan presas con diferente grado de movilidad, así sean adultos o juveniles. En general, *Geocoris* ataca al caminar o correr hasta una presa, sobre la cual extiende la proboscide y rápidamente inserta los estiletes (Crocker y Withcomb, 1980).

2.2 Interacciones tróficas. Definiciones ecológicas

Una cadena trófica sencilla puede presentar la siguiente organización estructural (Polis y Holt, 1992):

Nivel 1: productor primario (planta).

Nivel 2: consumidor primario (herbívoro).

Nivel 3: consumidor secundario (depredador intermedio).

Nivel4: consumidor terciario (depredador tope).

Cada uno de estos niveles tróficos afecta el desempeño del otro, ya que están fuertemente relacionados. Sin embargo; en la naturaleza, las cadenas tróficas no son relaciones simples y directas, como la descrita anteriormente (Vet y Godfray, 2008). Éste concepto ha sido reemplazado por el hecho de que realmente en condiciones naturales existen ensamblajes interconectados de redes, caracterizados por relaciones recurrentes de omnívora o competencia aparente. La combinación de eventos de competencia y depredación son importantes en el ensamblaje de una red trófica (Polis y Strong, 1996).

Se ha descrito en muchos trabajos que la competencia por el recurso y la depredación actúan simultáneamente influyendo en la coexistencia o exclusión de especies en las complejas redes de interacción depredador-presa, a través de procesos como la depredación intragremial o la competencia aparente (Polis y Holt, 1992; Bonsall y Holt, 1992).

2.2.1 Depredación intragremial: Definición y características principales

La DIG se define como la muerte y consumo de una presa por parte de un depredador, el cual comparte con su presa otros recursos del medio (Polis *et al.*, 1989). El término intragremial se refiere a que tanto el depredador como la presa intragremial son individuos que se encuentran en el mismo gremio, o sea que comparten los mismos recursos, independientemente de sus diferencias taxonómicas o tácticas en la adquisición del recurso, por tanto se ven involucrados en interacciones de competencia (Polis y Holt, 1992). Es por ello, que al depredador y a la presa intragremiales se les conoce también como competidores.

En teoría, cuando ocurre DIG es posible la coexistencia de las tres especies involucradas en la interacción trófica, incluyendo el recurso, solamente si el consumidor intermedio es superior al otro consumidor y por lo tanto más eficiente en cuanto a la competencia por el recurso (Holt y Polis, 1997).

La presa intragremial puede evitar al depredador superior teniendo en cuenta las señales que este emite. En dependencia de estas señales la presa intragremial ocupa una distribución en parches donde no abundan estos depredadores, lo que puede incrementar las posibilidades de coexistencia (Choh *et al.*, 2010). Entre las señales que la presa intragremial percibe del depredador están: las heces, los huevos, el edor, los juveniles muertos, entre otras (Faraji *et al.*, 2000; Argawala *et al.*, 2003; Choh *et al.*, 2010).

La DIG puede ser unidireccional, cuando una especie actúa siempre como depredador y la otra especie como presa intragremial. Además, esta relación puede ser mútua, cuando los depredadores se consumen el uno al otro (Vance-Chalcraft *et al.*, 2007).

Uno de los factores que influyen en la magnitud y simetría de la DIG, es la cantidad y calidad de la presa primaria (presa extragremial disponible). Se espera que un aumento en la población de la presa primaria disminuya la magnitud de la DIG, porque esto aumentaría la saciedad del depredador. Por ejemplo, Pérez-Ascencio (2014) detectó que *Geocoris punctipes* no consumía completamente a la presa intragremial (ninfas de *T vaporariorum* parasitadas con *E. eremicus*), producto de la existencia de otra presa en la arena (*M. persicae*). Claro que en la naturaleza este efecto sería más complejo, ya que se involucran otras especies, las cuales pueden recibir un efecto indirecto en la densidad de sus poblaciones, producto de la DIG (Lucas y Rosenheim, 2011).

Según (Vance-Chalcraft *et al.*, 2007), la compilación de algunos estudios ha evidenciado que el efecto de la DIG varía en diferentes ecosistemas (marinos, y sistemas de invertebrados y vertebrados terrestres). Los principales efectos de la DIG en estos sistemas pueden ser:

1. Disminución de la supresión de la presa intragremial.
2. Los depredadores intermedios son más eficientes que los depredadores topos en la supresión de la presa cuando actúan solos.

La depredación intragremial es un proceso dinámico donde los papeles de depredador y presa se pueden intercambiar en dependencia de las modificaciones morfológicas (crecimiento corporal), fisiológicas y de conducta (Polis *et al.*, 1989). Por ejemplo una

especie que en estadio larval es propensa a depredación intragremial, como adulto puede llegar a convertirse en depredador. Sin embargo, se ha demostrado que cada estado de desarrollo puede comportarse como depredador, presa, o ninguno de estos, dando un carácter asimétrico a la relación intragremial (Fréchette *et al.*, 2007).

Además, se ha observado que la intensidad de estas relaciones tróficas entre presas y depredadores pueden estar influenciados por el tamaño de la planta y su arquitectura (Chailleux *et al.*, 2013). Algunos estudios demuestran que la pubescencia de la hoja y la abundancia del depredador *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) están positivamente correlacionadas, pero negativamente correlacionada con el depredador *Euseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae). Ambos individuos se involucran en una interacción intragremial mutua, aunque *E. finlandicus* es más agresivo y más voraz que *K. aberrans*. En otros casos, la pubescencia de la hoja reduce la depredación o el éxito del parasitismo lo que ha sido reportado para *Encarsia formosa* (Sutterlin y van Lenteren, 1997, Seelman *et al.*, 2007).

Entre los factores que influyen en la ocurrencia de depredación intragremial se encuentran:

1. Talla corporal del depredador (Lucas *et al.*, 1998)
2. Especificidad de presa (Malo *et al.*, 2012)
3. Voracidad del depredador (Moreno-Ripoll *et al.*, 2012)
4. Disponibilidad de presas alternativas (Messelink *et al.*, 2013)
5. Los olores y pistas visuales que presenta la presa (Naranjo, 2007)
6. La estructura del hábitat (Malo *et al.*, 2012)
7. Las características de la planta (Seelman *et al.*, 2007)

Por ejemplo, se ha observado que los individuos más grandes son los depredadores intragremiales y los más pequeños resultan las presas intragremiales. Las confrontaciones de depredadores de la misma talla resultan en interacciones mutuas (Hyndeyana *et al.*, 2001).

2.2.2 Depredación intragremial sobre insectos parasitoides

La depredación intragremial ha sido reportada en varias etapas inmaduras de desarrollo de algunos parasitoides (Naranjo, 2007; Snyder e Ives, 2008; Velasco-Hernandez *et al.*, 2013; Sorhabi *et al.*, 2013). Aunque en algunos casos el parasitoide induce el endurecimiento de la cutícula del huésped y se forman espacios de aire que dificultan el ataque del depredador (Kutuk *et al.*, 2011).

En este contexto, la conducta del parasitoide puede variar manifestándose en un aumento de la tasa de ataque cuando el depredador está ausente, aunque en algunos sistemas biológicos se ha encontrado lo contrario, pero generalmente se altera la eficiencia del parasitoide y aumenta el tiempo de búsqueda para ovipositar (Martinou *et al.*, 2010).

Además, se ha observado que el parasitoide puede mitigar el riesgo de DIG, cambiando su conducta, en respuesta a señales químicas dejadas por el depredador. En estos lugares disminuyen los ataques del parasitoide a su huésped y los tiempos de residencia (Meisner *et al.*, 2011).

Otro aspecto señalado anteriormente, es que la depredación intragremial no ocurre por igual en todas las etapas del desarrollo de la presa intragremial. Se observó este fenómeno en el depredador *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae) sobre la presa *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) de la cual consumió preferentemente las ninfas que contenían larvas y no pupas del parasitoide. La causa de esto puede ser el endurecimiento de la cutícula de la ninfa que sirve de huésped al parasitoide; sin embargo, otros depredadores prefieren etapas avanzadas del parasitoide como es el caso de la chinche ojona, *Geocoris punctipes* (Say) (Naranjo, 2007) Por otra parte, Velasco-Hernandez *et al.* (2013) demostró que *G. punctipes* consume las ninfas de mosca blanca *T. vaporariorum* parasitadas, en condiciones de laboratorio. Sin embargo, el depredador muestra una preferencia por el consumo de ninfas no parasitadas en lugar de ninfas parasitadas.

Por otro lado, la etapa del huésped no es la única determinante de la conducta del depredador, sino que también depende del estado de desarrollo del depredador intragremial.

En este caso, tanto las ninfas como los adultos del depredador siguen el mismo comportamiento alimentario (Kutuk *et al.*, 2011).

Es interesante analizar cómo el parasitoide se mantiene en la planta hospedera incluso aunque esté el depredador presente (no hay cambios conductuales en el parasitoide que resulta la presa intragremial) (Velasco-Hernandez *et al.*, 2013). Por ejemplo, encontraron que *Aphidus colemani*, no rechaza los parches donde coinciden su huésped, y el depredador, la posible explicación está dada por:

1. La mayoría de las colonias en el campo son grandes lo que hace que disminuya el riesgo de DIG.
2. Muchos depredadores prefieren no alimentarse de presas parasitadas.

2.2.3 Implicaciones de la depredación intragremial en el control biológico

La depredación intragremial es común en sistemas manejados y naturales donde coinciden depredadores y presas (Rosenheim, 1995; Janssen *et al.*, 2007). Aunque es posible que se minimice o que no ocurra, lo que depende, entre otros factores, de la estructura del hábitat y la conducta de evasión del depredador (Janssen *et al.*, 2007). Es bien conocido que los depredadores pueden consumir la presa directamente del huevecillo donde se encuentran las mismas. Sin embargo, también pueden afectar indirectamente al parasitoide, pues pueden entorpecer el desempeño o conducta del mismo, lo cual es importante desde la perspectiva de la dinámica poblacional y su uso en el control biológico (Martinou *et al.*, 2010).

A pesar de los efectos previsibles negativos (Vance-Chalcraft *et al.*, 2007) que se observan en este fenómeno de depredación intragremial, se ha observado que la misma puede tener un efecto positivo en el control biológico de las plagas (Gardiner y Landis, 2007). Teniendo en cuenta que el efecto de la depredación intragremial puede ser positivo o negativo, las combinaciones óptimas de especies benéficas deben estar basadas en el conocimiento del sistema biológico y la posibilidad de depredación intragremial (Sorhabi *et al.*, 2013). Así, el uso simultáneo de una combinación óptima de especies benéficas en el control biológico

depende del conocimiento que se tenga de la intensidad de la depredación intragremial entre los agentes de control que se están utilizando (Meyling *et al.*, 2004).

Realmente es importante el conocimiento de la existencia o no de depredación intragremial en una red trófica. Si esta no ocurre, entonces es probable que la liberación simultánea de múltiples agentes de control sea más efectiva sobre la supresión de la presa que un solo agente de control. Sin embargo, si ocurre DIG unidireccional o mutua, entonces es más probable que un sólo agente de control, sea más efectivo en la supresión de la población de la presa que el uso combinado de múltiples agentes de control (Vance-Chalcraft *et al.*, 2007).

En algunos estudios se ha demostrado que aunque existe esta interacción, es posible usar de forma eficiente los individuos involucrados (presa + depredador intragremial) de forma simultánea, pero en distintas etapas de desarrollo, para permitir que el parasitoide alcance el estadio de pupa o larva donde el depredador no lo consuma (Kutuk *et al.*, 2011).

2.2.4 Escenarios semi-naturales y naturales donde ocurre DIG

En condiciones semi-naturales, por ejemplo, la evaluación de la interacción trófica en una red de insectos, se puede llevar a cabo a través de diferentes métodos como: los microcosmos (Madsen *et al.*, 2004) y las cajas de campo (Montemayor y Cave, 2012).

Un microcosmo según McCann (2000) es un experimento en pequeños espacios, como contenedores, frascos y cajas Petri, donde se busca crear comunidades ecológicas realistas dentro de un entorno controlado. La principal ventaja de trabajar con microcosmos es que el experimento puede ser fácilmente manipulado y replicado. Sin embargo, en ocasiones no se puede extrapolar el resultado a las condiciones naturales donde ocurren las comunidades en estudio (Lawton, 1995).

Los microcosmos van desde pequeñas cajas Petri en el laboratorio hasta espacios que contienen una planta en el caso de estudios de relaciones tróficas entre invertebrados (Koss *et al.*, 2004). Estos últimos simulan condiciones semi-naturales del fenómeno en estudio (Madsen *et al.*, 2004).

El uso de estos ambientes es más cercano a los ambientes naturales o agrícolas donde se desarrollan los individuos en cuestión. A diferencia del uso de estudios cajas de Petri en el laboratorio, donde los individuos son confinados a pequeños espacios. Este confinamiento, según Janssen *et al.* (2010) puede obstaculizar algunos de los comportamientos conductuales de la presa, por lo que idealmente se necesitan estudios en condiciones de mayor complejidad espacial y temporal para observar todo el repertorio de conductas de las especies en el sistema trófico.

Un ejemplo de la respuesta diferencial de los individuos en dependencia del ambiente en que están, es el estudio de especies depredadores de *Geocoris* spp. y *Nabis* spp. realizado por Koss *et al.* (2004). En este caso, se evaluaron los individuos en pequeños microcosmos constituidos por cajas de Petri y en largos microcosmos que contenían plantas de *Solanum tuberosum* L. En las placas resultó una mayor depredación sobre la presa alternativa que se ofreció a los individuos. Sin embargo, en los microcosmos con plantas, estas presas no interfirieron en el consumo de la presa primaria. Según estos autores, ocurre un aumento de la búsqueda del depredador que incluye movimientos lentos y repetidos lo que incrementa el encuentro con una presa cuando están limitados a un pequeño espacio.

Otro de los escenarios semi-naturales de evaluación de las interacciones tróficas lo constituyen las cajas de campo. Estas cajas pueden estar fabricadas con nylon o tela de malla fina y tubos de conducción (Montemayor y Cave, 2012), conformando cajas alrededor de un grupo de plantas en el campo. Las medidas de longitud, altura y ancho son diversas, al igual que los materiales utilizados para su construcción.

En el estudio de Montemayor y Cave (2012) se utilizaron las mismas para evaluar la capacidad de depredación de *Podisus maculiventris* sobre larvas de *Microtheca ochroloma* (Coleoptera: Chrysomelidae). Estas cajas permitieron manipular las densidades de los individuos y crear diferentes escenarios donde se establecieron diferentes interacciones tróficas. De esta forma se puede recomendar a los productores el modo de liberación de determinado enemigo natural en los programas integrados de manejo de plagas.

Por otra parte, muchos autores atribuyen gran importancia a los estudios realizados en condiciones naturales o de campo. Estos permiten realizar una estimación directa de la cantidad de depredadores en el campo, además no utilizan artefactos que puedan determinar ciertas conductas y los individuos no son aquellos criados en condiciones de laboratorio que son liberados y observados, sino los adaptados a un ambiente natural (Heimpel *et al.*, 1997).

2.2.5 Las presas alternativas

El concepto de presa alternativa, se puede asignar a un herbívoro arbitrariamente, por ejemplo, Koss *et al.* (2004) establecieron en su estudio como presa alternativa una especie que potencialmente puede encontrarse como un recurso adicional en el medio, en presencia de otra presa que fue considerada como la presa primaria.

Un aspecto importante es la densidad de cada presa en un sistema de estudio, ya que se ha visto que muchos depredadores consumen con preferencia la presa más abundante en un parche (Koss *et al.*, 2004). Por lo tanto, desde el punto de vista del control biológico la conducta del depredador hacia la presa alternativa puede provocar una disrupción del control biológico o un mejoramiento del mismo.

La cantidad de presa primaria y alternativa, así como las preferencias del depredador, son factores importantes en un sistema trófico. Un aumento en la población de una de las presas, puede liberar la presión de depredación en la otra especie. Por ejemplo, en un estudio realizado por Eubanks y Denno (2000), el depredador *G. punctipes* se expuso a dos presas, el pulgón *Acyrtosiphum pisum* (Homoptera: Aphididae) y los huevos de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) y se observó que un aumento en la cantidad de pulgones provocó una disminución en el consumo de los huevos del lepidóptero y de forma viceversa (un aumento en la cantidad de huevos de lepidópteros) no hubo un efecto en la conducta alimentaria del depredador. Por lo tanto la selección de la presa depende no sólo de la abundancia y susceptibilidad de cada presa, sino también de las preferencias del depredador.

2.3 Metodologías de estudio de las interacciones tróficas entre individuos

Los métodos utilizados por los distintos grupos de investigación se basan en la observación visual, en el análisis del tubo digestivo mediante disecciones de individuos colectados, electroforesis de isoenzimas, marcaje con radioisótopos, detección de pigmentos de la presa en el depredador, la detección mediante anticuerpos policlonales y las técnicas basadas en el ADN (Sheppard y Harwood, 2005).

Las observaciones directas en el campo, son un método de estudio que permiten detectar las relaciones existentes entre los insectos en condiciones naturales y cómo estas pueden estar afectadas por la dinámica de la comunidad. Un ejemplo, es el estudio realizado por Heimpel *et al.* (1997), donde se describen todos los depredadores involucrados en el consumo de dos parasitoides del género *Aphytis*. Se demostró que los depredadores generalistas que operan en el cuarto nivel trófico, afectan fuertemente el éxito reproductivo de los insectos parasitoides estudiados.

Sin embargo, la observación en campo tiene varias desventajas, en ocasiones los individuos consumidos o parasitados son difíciles de visualizar e identificar (Moreno-Ripoll *et al.*, 2012). Es por ello que se utilizan como complementos a los estudios basados en la observación de los individuos, los métodos de análisis moleculares.

2.3.1 Análisis basados en el ADN mediante PCR

Otras formas de identificar el contenido del tubo digestivo del depredador son los análisis basados en el ADN. Para el desarrollo exitoso de esta metodología hay que tener en cuenta aspectos como: la selección de un gen de interés (que será identificado en la presa), el diseño de cebadores que amplifiquen de forma específica el gen de interés y la realización de ensayos de calibración en el laboratorio (Aebi *et al.*, 2011).

La selección del gen de interés se puede realizar mediante una búsqueda exhaustiva en bases de datos como el GenBank o en artículos publicados donde se describa la especie de interés (Aebi *et al.*, 2011). A partir de estas secuencias conocidas se pueden crear los cebadores. Estas enormes bases de datos contienen información de las secuencias de ADN

disponible para miles de especies y se puede acceder para buscar los cebadores especie-específicos para el análisis de ADN (Sheppard y Harwood, 2005).

En general los genes más utilizados para el estudio de la depredación intragremial en insectos incluyen genes mitocondriales multicopia codificantes para las subunidades proteicas I y II de la citocromo oxidasa (COI, COII), ribosomales (12S y 16S) o la región espaciadora (ITS-1). La amplificación de fragmentos cortos (100-200pb) de genes multicopia, maximiza las posibilidades de detección y conservación del ADN de la presa durante la digestión en el depredador (Agustí *et al.*, 2003; Aebi *et al.*, 2011).

Cuando la longitud del fragmento está entre los pares de bases mencionados anteriormente, la permanencia en el tracto digestivo del depredador ocurre por más tiempo. Este es el caso del estudio realizado por Hoogendoorn y Heimpel (2001), quienes al analizar todos los fragmentos disponibles, sólo detectaron el más pequeño (150pb) en muestras de ADN extraídas del depredador 12 horas posteriores al consumo.

La reacción en cadena de la polimerasa PCR es una amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN. Es el método utilizado para detectar, amplificar y visualizar el ADN de la presa consumida por el depredador. Esta técnica es muy utilizado debido a que su ejecución es relativamente simple y de bajo costo (Sheppard y Harwood, 2005).

La mezcla de reacción consta de una cantidad mínima de ADN, los nucleótidos, los cebadores y la enzima polimerasa termoestable. La PCR tiene una secuencia de pasos básicos (desnaturalización, hibridación y extensión), que se utilizan independientemente del modelo biológico de estudio.

3. Hipótesis

En condiciones semi-naturales, el depredador *Geocoris punctipes* no establece interacciones tróficas con otro enemigo natural (la avispa *Eretmocerus eremicus*) de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*, ni con otro insecto herbívoro (el pulgón *Myzus persicae*), sólo con la mosca blanca.

4. Objetivos

1. Determinar a través de técnicas moleculares si *Geocoris punctipes* se alimenta de la avispa *Eretmocerus eremicus* (i.e. le infringe depredación intragremial).
2. Determinar a través de técnicas moleculares si el depredador se alimenta de *T. vaporariorum*.
3. Determinar el grado de infestación por mosca blanca (*T. vaporariorum*) y la emergencia de las avispas en las diferentes combinaciones de enemigos naturales.
4. Determinar si existe depredación intragremial entre *G. punctipes* y *E. eremicus* en presencia de una presa alternativa (*M. persicae*).
5. Determinar en condiciones semi-naturales si la presencia de una presa alternativa (*M. persicae*) provoca que el depredador *G. punctipes* consuma menos ninfas de mosca blanca y en consecuencia produce un aumento en la densidad de MB adultas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Plantas

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Saladette') se utilizó en los experimentos en condiciones semi-naturales (microcosmos), así como para el mantenimiento de las colonias de la mosca blanca (*T. vaporariorum*) en el Laboratorio de Control Biológico, CUCBA, Universidad de Guadalajara. El chile *Capsicum annum* L. cv. Tampiqueño, se utilizó solamente para la cría del pulgón *Myzus persicae* en el laboratorio. Ambas semillas se obtuvieron de la Casa del Hortelano S.A. de C.V. (Guadalajara, Jalisco, México). El procedimiento para la obtención de las plantas comenzó con la siembra en charolas de polietileno con cavidades de 7cm de profundidad y 2.5 cm de diámetro. Cada cavidad de la charola se llenó con estopa de coco (Germinasa S.A. de C.V.), como sustrato, el cual se humedeció con agua para facilitar su compactación. Posteriormente se sembraron 1 ó 2 semillas por cavidad para garantizar al menos la germinación de una planta. Aproximadamente a la semana emergieron las plantas, las cuales se trasplantaron cuando emitieron la tercera hoja verdadera. En esta fase, la planta se trasplantó a diferentes macetas, de acuerdo con su uso (laboratorio o condiciones semi-naturales).

Las plantas utilizadas para el mantenimiento de las colonias de mosca blanca y pulgón en el laboratorio, se trasplantaron a macetas de plástico 10 cm de diámetro con una mezcla de tierra Nutrigarden (Sulfatos derivados S.A. de C. V.) y perlita (Agrolita de México S.A. de C.V.) en una proporción (50:50). El riego se realizó dos veces por semana con una solución nutritiva de fertilizante triple 18 (SQM Comercial de México S.A. de C.V). Las plantas permanecieron en estantes libres de mosca blanca. Estos estantes estaban cubiertos por organza, y sólo se abrieron para el riego de las plantas y se inspeccionaron para verificar que estuvieran sin la plaga dentro del laboratorio, en condiciones de $24\pm 3^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo de 14:10 horas (luz: oscuridad) hasta que fue necesario introducirlas en las colonias de mosca blanca.

Las plantas de jitomate utilizadas en el bioensayo en condiciones semi-naturales se sembraron en semilleros como se describió anteriormente, pero el trasplante se realizó a las macetas 8" (16cm de altura, 18cm de diámetro) (Viveros JM SA de CV, Jalisco, México), en un sustrato conteniendo piedra pómez (Earthbox, México S.A.P.I de C.V.), estopa de

coco Germinaza® (Germinasa S.A. de C.V.) y humus de lombriz Lombrifert® (Planta piloto de Lombricultura, CUCBA, Universidad de Guadalajara) en una proporción 1:1:1. Una vez sembradas, se cubrieron con el microcosmo (ver abajo para detalles) y se mantuvieron dentro de jaulas experimentales (ver abajo para detalles) afuera del laboratorio, libre de herbívoros por una semana, para su establecimiento en las nuevas condiciones. El riego se realizó con solución nutritiva, similar al descrito para las plantas del laboratorio y no se aplicaron insecticidas.

5.2 Insectos plaga del estudio

5.2.1 Mosca blanca *T. vaporariorum*

Las moscas blancas (*Trialeurodes vaporariorum*) utilizadas en el experimento provinieron de las colonias establecidas en el Laboratorio de Control Biológico en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara). Estas colonias se iniciaron a partir de individuos donados por el Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, en junio de 2010 y verificados taxonómicamente por el especialista en Aleyrodidae de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Las colonias de estos insectos (libres de virus) se desarrollaron sobre las plantas de jitomate encerradas en jaulas de acrílico (45cm de alto x 38cm de largo x 30 cm de ancho) con los orificios laterales y el superior cubiertos con organza cristal (Modatelas, Guadalajara). Las condiciones de cría fueron: $24\pm 3^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

5.2.2 Pulgón *Myzus persicae*

El pulgón *Myzus persicae* (presa alternativa) fue obtenido a partir de las colonias mantenidas en el Laboratorio de Control Biológico en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. Los insectos se criaron sobre plantas de chile, en jaulas de acrílico (45cm de alto x 38cm de largo x 30 cm de ancho) con los orificios laterales y el superior cubiertos con organza cristal. Las condiciones de cría fueron: $24\pm 3^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

Estos individuos se utilizaron en el Bioensayo 2 (sin presa alternativa). Se ubicaron los estadios tercero y cuarto del pulgón (Pérez-Ascencio, 2014), para asegurar que la reproducción de los mismos no afectara la densidad de la población de los tratamientos (Eubanks y Denno, 2000).

5.3 Enemigos naturales

5.3.1 Avispa parasitoide *Eretmocerus eremicus*

Las avispas fueron obtenidas de la empresa Koppert México S.A. de C.V (Querétaro, México), en sobres que contenían 3000 ninfas de moscas blancas parasitadas. Una vez que llegaban estos insectos se colocaban los sobres adentro de jaulas de acrílico (45cm de alto x 38cm de largo x 30 cm de ancho). Las avispas que emergían se alimentaban con una dieta artificial *ad libitum* que contenía solución (7:3ml, miel: agua), la cual se ubicó sobre papel toalla de 7cm². Además, en otro papel toalla de las mismas dimensiones se adicionó agua (10ml) y se colocó sobre una caja Petri (9cm de diámetro) la dieta y el agua fueron cambiadas diariamente. Se mantuvieron en condiciones de 24±3°C, 50 ± 10% de HR y un fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

Se utilizaron 19 parejas de adultos para los bioensayos, entre 2-4 días de edad. Se escogió ese rango de edad porque después de este periodo disminuye exponencialmente la oviposición (Soler y van Lenteren, 2004) ya que puede ocurrir reabsorción de los huevos y según Asplen *et al.* (2001), existe más probabilidad de apareamiento en esa etapa; aunque desde el primer día se pueden aparear. Es por ello que una vez emergidas el primer día, se seleccionaron las parejas y se aislaron en una caja Petri (9cm de diámetro) y se mantuvieron con la dieta artificial y el agua, en las mismas condiciones descritas anteriormente, hasta el día siguiente donde se ubicaron en los tratamientos que requerían su presencia (ver abajo para detalles), de esta forma consideramos que estaban apareadas previamente antes de comenzar los bioensayos.

La cantidad de avispas en el sistema está relacionada con la tasa de oviposición diaria, (3-5 ninfas diarias, por hembra parasitoide) (Powell y Bellows, 1992), por lo que para parasitar 200-230 ninfas se necesitaron 19 parejas de avispas.

5.3.2 Chinche depredadora *Geocoris punctipes*

Los depredadores fueron adquiridos de la empresa Organismos Benéficos para la Agricultura (Autlán, Jalisco). Los individuos llegaron como ninfas en frascos de 100 unidades. Estas ninfas fueron mantenidas en cajas de polietileno (40 cm largo x 30 cm de ancho x 45 cm de alto) en condiciones de $24 \pm 3^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de HR y un fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad). La alimentación fue *ad libitum* con una dieta artificial suplementos alimenticios como 5g de polen (Apiarios Rancano, D.F., México) y 10 g de semillas de sorgo UDG-110 (UDG, México) y agua (10ml). El agua se suministró en papel toalla de 7cm^2 y se cambió diariamente al igual que la dieta artificial. La dieta se aprovisionó utilizando círculos de polietileno de 2.5cm de diámetro, los cuales se ubicaron con la dieta en las esquinas de la jaula y al centro, para alimentar 100 chinches, mientras que los suplementos se cambiaron una vez a la semana.

Se utilizaron en los bioensayos seis hembras adultas, teniendo en cuenta la tasa de consumo por hembra por día, (observaciones preliminares en el laboratorio) y el número inicial de ninfas en el bioensayo 200-230 (ver bioensayo en la sección siguiente). Los individuos se utilizaron entre el rango de edad de 5-20 días, considerando que a los 5 días las hembras pueden producir huevos fértiles y los individuos pueden llegar a vivir hasta 10 semanas (Champlain y Sholdt, 1967).

5.4 Efecto de la depredación de *G. punctipes* sobre las poblaciones de mosca blanca y avispa parasitoide en los microcosmos

5.4.1 Sin presa alternativa

El experimento se realizó en el periodo de abril-julio de 2014, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias ($20^\circ 44' 47''\text{N}$ $103^\circ 30' 43''\text{O}$), Universidad de Guadalajara, Jalisco. En este lugar, se ubicó una jaula experimental, de madera y malla anti-áfidos, de dimensiones $3\text{m} \times 3\text{m} \times 3\text{m}$ (altura, largo y ancho respectivamente). Dentro de la jaula se ubicaron los microcosmos para la confinación de los insectos en cada tratamiento.

Los microcosmos fueron cilindros de mica de 28cm de altura x 18 cm de diámetro de la base. Además, tenían 6 orificios laterales y uno superior de 9,5cm de diámetro, cubiertos de

organza cristal, para propiciar la aeración sin escape de los insectos. La base de cada cilindro, estuvo reforzada con hule (empaques cubrefilo de 1/2cm) y alambre galvanizado, para dar soporte a la estructura. Los microcosmos fueron ubicados sobre las macetas que contenían 1 planta de jitomate de 3-4 hojas verdaderas. Para evitar el escape de los insectos se selló con plástico adherente la unión de la maceta a la base del microcosmo (Figura 1).



Figura 1: Izquierda, microcosmo de mica y organza con soporte de hule en la base; Centro, microcosmo sellado sobre la maceta que contiene una planta de jitomate; Derecha, jaula de campo experimental para la ubicación de los microcosmos utilizados en condiciones semi-naturales.

Cada microcosmo se infestó con 150 moscas blancas adultas, con ayuda de un aspirador. Se dejaron en la planta por un periodo de 48 horas (Velasco-Hernandez *et al.*, 2013) y después se retiraron. A los 14 días posteriores a la infestación, se supervisó el número de ninfas de mosca blanca entre segundo y tercer estadio, en cada planta. El conteo se realizó con una lupa de joyero 40x Magnifier® (Victorinox) en la cámara oscura del laboratorio de control biológico. Para aplicar los tratamientos cada planta tuvo entre 200-230 ninfas de mosca blanca. Ocasionalmente se removieron ninfas de primer estadio.

Se establecieron cinco tratamientos, cada uno fue replicado 11 veces:

- 1) control, sólo con ninfas de la mosca blanca, (NMB)
- 2) las ninfas de mosca blanca y *G. punctipes*, (NMB+G)

- 3) las ninfas de mosca blanca, *G. punctipes* y *E. eremicus* (simultáneo), (NMB+A+G sim)
- 4) las ninfas de mosca blanca, *G. punctipes* y *E. eremicus* (secuencial), (NMB+A+G sec)
- 5) las ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*, (NMB+A)

El tratamiento 1 (NMB) contenía solamente las ninfas de mosca blanca entre segundo y tercer estadio y constituye el control del experimento. En el caso del tratamiento 2 (NMB+G) la variación radica en la introducción de el enemigo natural *G. punctipes* en combinación con las ninfas de mosca blanca, el cual se dejó forrajear por 48h y luego se retiró con ayuda de un aspirador. Estas muestras se guardaron en viales de 1.5ml en alcohol al 70% y a una T=4°C (Gagnon *et al.*, 2001). El tratamiento 3 (NMB+A+G sim), simultáneo se refiere a la introducción de ambos enemigos naturales en el microcosmo para permitir su interacción con las ninfas de mosca blanca por un periodo de 48h (Malo *et al.*, 2012), después de este tiempo, se colectaron y almacenaron los *G. punctipes* como se mencionó previamente. Las avispas se retiraron y se sacrificaron. El tratamiento 4 (NMB+A+G sec) secuencial se refiere a la introducción solamente de la avispa (luego de realizar el conteo de las ninfas de mosca blanca, a los 14 días después de la infestación) en los microcosmos para permitir la oviposición de la misma, por un período de 48h (Malo *et al.*, 2012) Una vez cumplido este tiempo, las avispas fueron removidas y se esperó entre 18-20 días, para introducir a los individuos de *G. punctipes* por 48h; después de las cuales se colectaron y almacenaron en las condiciones arriba descritas por último, en el tratamiento 5 (NMB+A) sólo se permitió a las avispas parasitoides el contacto con las ninfas de mosca blanca durante un periodo de 48h.

5.4.1.1 Diseño experimental y variables de respuesta

Luego de las 48h de exposición del depredador *G. punctipes* a las presas, en los tratamientos 2 (NMB+G), 3(NMB+A+G sim) y 4(NMB+A+G sec), se contó el número de ninfas de mosca blanca consumidas el mismo día que se retiró el depredador de cada tratamiento. Se escogió este momento, porque las plantas estaban en condiciones semi-naturales, donde los factores climáticos (lluvia, temperatura) pueden contribuir al desprendimiento de las ninfas o la desecación (Naranjo *et al.*, 2004). El conteo se realizó utilizando el estereoscopio Zeiss, ubicando la planta a la altura de la platina de observación y extendiendo las hojas cuidadosamente sobre la misma, de esa forma, se puede observar con aumento de 40X, las ninfas depredadas. Una vez finalizado el conteo se llevó el

microcosmo a la jaula de campo y permaneció sin disturbios hasta la emergencia de las moscas.

La depredación se determinó mediante observaciones al estereoscopio 40x Zeiss (DVD Carl Zeiss), identificando la presencia de una cutícula vacía sin la presencia del orificio de emergencia de las moscas (Malo *et al.*, 2012), al igual que las ninfas parasitadas consumidas, las cuales presentaban sólo la cutícula del huésped (Naranjo, 2007).

A los 30 días de haber iniciado el experimento, se realizó el conteo de moscas blancas. De acuerdo a las condiciones del ciclo de vida descritas para *T. vaporariorum* (Byrne y Bellows, 1991; Soto *et al.*, 1999), se comenzó la inspección de las plantas a partir del día 21, hasta notar la emergencia de las moscas que comenzó el día 27. Se decidió dejar el microcosmos sin disturbios por la variación en la oviposición (ya que las moscas en un inicio pudieron ovipositar el primer día o el segundo). Para recolectar a *G. punctipes* se utilizó un aspirador y se revisó cuidadosamente la planta, el cilindro de mica y la base de la maceta. Todo el procedimiento se realizó en la cámara oscura del laboratorio.

Además, en los tratamientos (NMB+A+G sim), (NMB+A+G sec) y (NMB+A) se contaron las ninfas parasitadas a los 18 días después de la introducción de la avispa. La elección del tiempo corresponde con el momento en donde es apreciable por simple inspección visual la presencia del parasitoide dentro de la ninfa (Velasco-Hernandez *et al.*, 2013), en este caso se contó el número de ninfas parasitadas con ayuda de un estereoscopio DV4 Carl Zeiss.

Por último se contaron las avispas entre los 25 y 27 días (que emergieron de cada tratamiento) con ayuda de un aspirador. De acuerdo a las condiciones descritas para el ciclo de vida de las avispas (Powell y Bellows, 1992). Se decidió inspeccionar diariamente los microcosmos hasta observar la emergencia de las avispas. En todos los tratamientos para el día 28 (de la infestación por mosca blanca) se realizó el conteo de las avispas emergidas. El conteo se realizó en la cámara oscura del laboratorio de control biológico y revisando cuidadosamente cada hoja ya que muchas avispas se encontraban quietas en las mismas. Tanto las avispas como las chinches se guardaron como “Voucher” en el Laboratorio de Control Biológico, CUCBA, Universidad de Guadalajara (2 individuos como mínimo).

Las variables de respuesta que se obtuvieron fueron: 1) Número promedio de ninfas consumidas, 2) número promedio de moscas emergidas, 3) número promedio de ninfas parasitadas y 4) número promedio de avispas emergidas. Las variables de respuesta 1, 3 y 4 cumplieron las premisas por lo que la comparación entre los tratamientos se realizó mediante Análisis de Varianza (ANOVA paramétrico), seguido de una comparación de medias *a posteriori* de Tukey $p < 0.05$. En el caso de la variable 4 (ninfas parasitadas), se siguió un ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de una comparación múltiple no paramétrica (Zar, 1999), a través del programa estadístico Statistica 8.0. En los resultados aparece la comparación solamente entre los tratamientos que contenían la variable de interés los que no tienen medida de la variable de interés no se incluyen en el análisis, similar a lo realizado por Moreno-Ripoll *et al.* (2014).

Se siguió un diseño completamente aleatorio en bloques, teniendo como factor de bloque el tiempo y como factor de interés el enemigo natural o su combinación. El factor de bloque fue incluido en el análisis. Las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el periodo fueron monitoreadas con un datalogger RHT-10 (Extech Instruments S.A. de C.V). La temperatura promedio durante el experimento fue $25.31 \pm 0.35^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa fue de $55.48 \pm 1.8\%$.

5.4.2 Con presa alternativa

Este bioensayo se realizó para observar el efecto de la depredación de la chinche en las poblaciones de mosca blanca y avispa, con la adición de una presa alternativa en la red trófica. Las interacciones tróficas que se pudieran detectar en ambos experimentos descritos en la tesis entre ellas se destacan la posibilidad de depredación intragremial entre la chinche y la avispa (Figura 2). En ella se muestran los nombres comunes de las especies: jitomate: (*Solanum lycopersicum* cv. “Saladette”), ninfa de mosca blanca: (estado inmaduro de *Trialeurodes vaporariorum*), pulgón: (*Myzus persicae*), avispa: (*Eretmocerus eremicus*), chinche: (*Geocoris punctipes*).

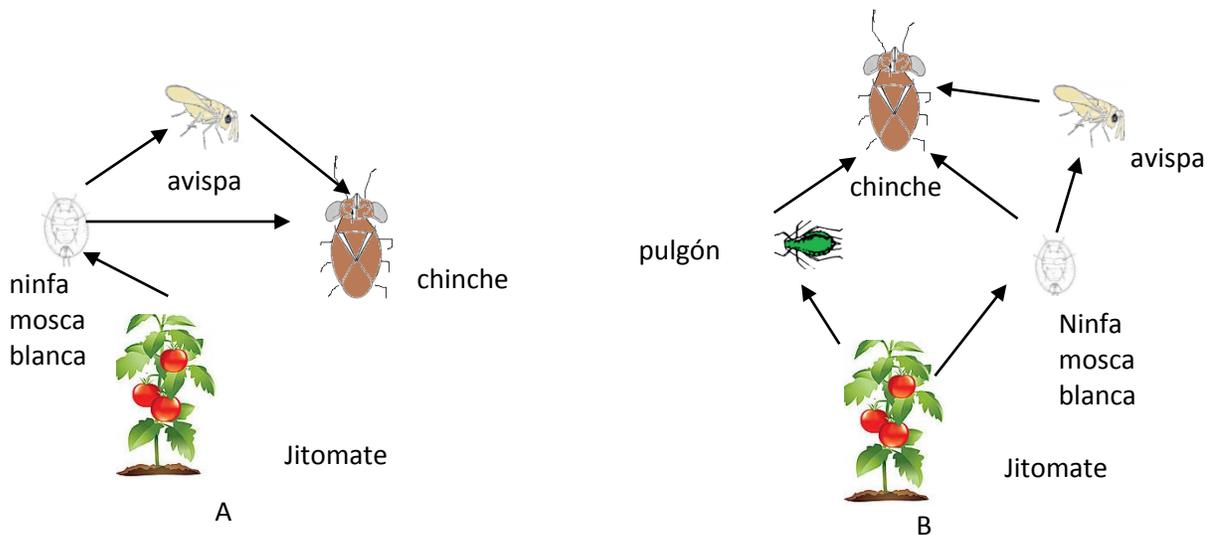


Figura 2: Posibles relaciones tróficas entre los individuos ubicados en cada bioensayo. A. La planta de jitomate huésped de la presa primaria *T. vaporariorum* (ninfas de mosca blanca) en combinación con los enemigos naturales (*G. punctipes* y *E. eremicus*). B. La red trófica descrita en A con la presencia de *Myzus persicae*.

El bioensayo 2 se realizó en las fechas de septiembre- noviembre de 2014, en la misma área que el bioensayo 1. Para este bioensayo se ubicaron dos jaulas experimentales de madera y malla anti-áfidos, de dimensiones 3mx3mx3m, debido al aumento del número de tratamientos. Dentro de la jaula se ubicaron los microcosmos utilizados en el primer bioensayo, previamente se lavaron con agua y detergente y se desinfectaron con alcohol 70%. Todas las condiciones experimentales fueron similares al bioensayo anterior. Los tratamientos se replicaron 9 veces y fueron los siguientes:

- 1) Ninfas de *T. vaporariorum*, (NMB)
- 2) Ninfas de *T. vaporariorum*, *M. persicae*, *G. punctipes* y *E. eremicus* (simultáneo), (NMB+P+A+G sim)
- 3) Ninfas de *T. vaporariorum*, *M. persicae*, *G. punctipes* y *E. eremicus* (secuencial), (NMB+P+A+ G sec)
- 4) Ninfas de *T. vaporariorum*, *E. eremicus* y *G. punctipes* (simultáneo), (NMB+A+G sim)

- 5) Ninfas de *T. vaporariorum*, *E. eremicus* y *G. punctipes* (secuencial), (NMB+A+G sec)
- 6) Ninfas de *T. vaporariorum* y *E. eremicus*, (NMB+A)

La adición de los pulgones se realizó con ayuda de un pincel. Los pulgones se dejaron sin disturbios en los microcosmos durante 12 horas, para que tuvieran tiempo de localizarse en los sitios de alimentación en la planta (Koss *et al.*, 2004). Después se añadieron los enemigos naturales de forma simultánea en los tratamientos 2 (NMB+P+A+G sim) y 4 (NMB+A+G sim) y de forma secuencial en los tratamientos 3 (NMB+P+A+ G sec) y 5 (NMB+A+G sec) con 19 parejas de avispas y 6 chinches hembras.

Para aplicar los tratamientos cada planta debía tener entre 100-115 ninfas de mosca blanca. Los tratamientos que contenían una sola presa (herbívoro) tenían entre 110-115 individuos en el caso de los tratamientos que llevaban presa alternativa, se adicionó la misma cantidad de pulgones y de ninfas de mosca blanca (110-115), de manera que el número total de presas fue 200-230, similar a lo realizado por Eubanks y Denno (2000).

El tratamiento 1 (NMB) se consideró el tratamiento control, y sólo tuvo ninfas de mosca blanca entre segundo y tercer estadio en la planta de jitomate. El tratamiento 2 (NMB+P+A+G sim) consistió en la presencia de la presa primaria (NMB) en adición con la presa alternativa (P) y se introdujo de forma simultánea a los enemigos naturales *G. punctipes* y *E. eremicus*, los cuales se dejaron forrajear por un periodo de 48h, luego del cual se retiraron de la planta con ayuda de un aspirador. En el caso del tratamiento 3 (NMB+P+A+G sec), aunque están presentes los mismos individuos que en el tratamiento 2, la diferencia radicó en la introducción solamente de la avispa (luego de realizar el conteo de las ninfas de mosca blanca, a los 14 días después de la infestación) en los microcosmos, para permitir la oviposición de la misma, por un período de 48h (Malo *et al.*, 2012). Después de sacar las avispas entre 18-20 días se introdujo en cada microcosmo a los pulgones y 12h después a los individuos de *G. punctipes* los cuales estuvieron en contacto con las presas por un periodo de 48h. El tratamiento 4 (NMB+A+G sim) simultáneo se formó a partir de la introducción de ambos enemigos naturales en el microcosmos para permitir su interacción con las ninfas de mosca blanca por un periodo de 48h (Malo *et al.*,

2012); después de este tiempo, se retiraron de los microcosmos. El tratamiento 5(NMB+A+G sec) significó la introducción solamente de la avispa (luego de realizar el conteo de las ninfas de mosca blanca, a los 14 días después de la infestación) en los microcosmos, para permitir la oviposición de la misma, por un período de 48h (Malo *et al.*, 2012) luego de sacarlas se esperó entre 18-20 días, y se introdujo en cada microcosmo a los individuos de *G. punctipes* por un periodo de 48h, después de las cuales se retiraron del mismo. Por último, en el tratamiento 6 (NMB+A), se tuvo la combinación de NMB y la avispa parasitoide, la cual se dejó forrajear para que ovipositará en un periodo de 48h y después se retiró del microcosmo. Tanto las avispas como las chinches se guardaron como “Voucher” en el laboratorio (2 individuos como mínimo).

5.4.2.1 Diseño experimental y variables de respuesta

Luego de extraer las chinches, se contó el número de ninfas depredadas en los tratamientos 2 (NMB+P+A+G sim), 3(NMB+P+ A+G sec), 4(NMB+A+G sim) y 5 ((NMB+A+G sim) el mismo día que se retiró el depredador de cada tratamiento. Se escogió este momento, porque las plantas estaban en condiciones semi-naturales, donde los factores climáticos (lluvia, temperatura) pueden contribuir al desprendimiento de las ninfas o la desecación (Naranjo *et al.*, 2004). Se realizó el mismo procedimiento para el conteo de ninfas depredadas seguido en el bioensayo sin presa alternativa Los pulgones que no fueron consumidos se contaron (Koss *et al.*, 2004) y se dejaron permanecer con la presa focal durante todo el experimento.

A los 30 días, se contaron los adultos de mosca blanca emergidos en cada tratamiento, utilizando un aspirador. Se ha observado que *T. vaporariorum* tiene un tiempo de desarrollo de 21-30 días, dependiendo de la temperatura (Byrne y Bellows, 1991), por ejemplo a 24°C se ha observado que en promedio el periodo de desarrollo es de 26.4 días (Soto *et al.*, 1999), similar a lo observado en nuestro laboratorio, por eso las plantas se comenzaron a inspeccionar a partir del día 21, hasta notar la emergencia de las moscas que comenzó el día 27 después de la infestación con mosca blanca. Se decidió dejar el microcosmos sin disturbios por la variación en la oviposición (ya que las moscas en un inicio pudieron ovipositar el primer día o el segundo), por tanto a los 30 días se comenzó el conteo de moscas, temprano en la mañana.

En el caso de los tratamientos (NMB+A+G sim), (NMB+A+G sec), (NMB+P+A+G sim), (NMB+P+A+G sec), (NMB+A), se contó el número de ninfas parasitadas, a los 18 días posteriores a la introducción de las avispas, ya que en este tiempo es posible observar las ninfas parasitadas, teniendo en cuenta su coloración café, que las distingue de las ninfas no parasitadas (Velasco-Hernandez *et al.*, 2013), siguiendo el procedimiento del bioensayo sin presa alternativa. Mientras que el número de avispas adultas emergidas en cada tratamiento, se contó entre 25 y 27 días. Las avispas completan su ciclo de desarrollo entre 33.9 y 36.3 días a 20°C y entre 16.10 y 18.9 días a 29°C, con una tendencia a cortarse el ciclo según el aumento de la temperatura (Powell y Bellows, 1992), por lo que se decidió, después de sacar los depredadores, inspeccionar diariamente los microcosmos hasta observar la emergencia de las avispas. A los 25 días comenzaron a emerger y se dejaron dos días, ya que podían haber algunas que no emergieran todavía, por tanto al día 28 (de la infestación por mosca blanca) se realizó el conteo de las avispas emergidas en todos los tratamientos, no se dejaron más tiempo en los microcosmos, porque muchas hojas se estaban dañando por el hongo provocado por la mielecilla. El conteo de las avispas emergidas se realizó igual que en el bioensayo sin presa alternativa.

Las variables de respuesta que se obtuvieron fueron: Número promedio de ninfas consumidas, número promedio de moscas emergidas, número promedio de ninfas parasitadas, número promedio de pulgones no depredados y número promedio de avispas emergidas, se compararon entre los tratamientos mediante análisis de varianza (ANOVA paramétrico) pero solo en el caso de las variables ninfas consumidas, pulgones no depredados, moscas blancas emergidas. Al analizar las variables ninfas parasitadas y avispas emergidas, se siguió un ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de una comparación múltiple no paramétrica, a través del programa estadístico Statistica 8.0.

Se siguió un diseño completamente aleatorio en bloques, teniendo como factor de bloqueo el tiempo y como factor de interés la influencia del enemigo natural o su combinación en la población de mosca blanca y de la avispa parasitoide, en presencia de una presa alternativa. Se utilizó para el procesamiento descrito por Zar (1999), utilizando el programa Statistica versión 8.0.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el periodo fueron monitoreadas con un datalogger RHT-10 (Extech Instruments, S.A. de C.V.).

5.5 Análisis molecular de los individuos de *G. punctipes* colectados de la red trófica más simple (Bioensayo 1, sin presa alternativa)

5.5.1 Extracción de ADN

Para determinar si ocurría DIG, se aisló el ADN total de cada *G. punctipes* con el fin de detectar el ADN de las presas (*E. eremicus* y *T. vaporariorum*) de los tratamientos 2(MB+G), 3(MB+A+G sim) y 4(MB+a+G sec). La extracción se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Cenis *et al.* (1993), en el cual, cada individuo colectado en un tubo eppendorf de 2.0ml fue macerado en 100µl de una solución de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), utilizando un pistilo (Kollet). Posteriormente se añadieron 100 µl de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y se incubó a -20°C durante 10 min. Después de centrifugar 10min. a 13 000 se recuperó el sobrenadante y el ADN se precipitó con isopropanol. El sedimento se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en 35 µl de solución TE (10 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH). La integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó mediante un espectrofotómetro Q5000 Quawell (Quawell Technology, CA, EE.UU). El ADN se almacenó a -20 ° C hasta su uso.

Para la detección de las presas, se utilizaron cebadores para las regiones mitocondriales codificantes del gen COI-1 para detectar las moscas blancas (Moreno-Ripoll *et al.*, 2012) y de la región ITS-1 ribosomal para detectar la avispa. En el caso de la avispa, se diseñaron cebadores específicos que amplifican un fragmento de 143 pares a partir de la secuencia AB662973 reportada en Genbank, utilizando el programa CLC SequencerViewer versión 6.0. En ambos casos, se evaluó la especificidad de los cebadores en especímenes de la red trófica. En la tabla 1 se muestran los cebadores, la temperatura de alineamiento y el tamaño del fragmento esperado.

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio para la detección de ADN de las presas en *Geocoris punctipes*.

Especie	Gen	Secuencia	Amplificación	Ta
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	COI 1	5'TCTCACAGGGGGTGA TTT-3' 5'CTGGGAAAGAAGAAG GTAAA-3'	187pb	63°C
<i>Eretmocerus Eremicus</i>	ITS-1	5'TTGGTGTCTCAATTTT ATATC-3' 5'ATACTCAAATCCTT CCCGC-3'	143 pb	65°C

5.5.2 Análisis por PCR:

Las amplificaciones de PCR se realizaron en un termociclador Swift termo maxi (ESCO, PA, EE.UU.). Las reacciones se prepararon en un volumen total de reacción de 25 µl que contenía 500 ng de ADN, solución de PCR 1X (50 mM de KCl; mM Tris-HCl 20, pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada cebador y 2 U de Taq ADN polimerasa Invitrogen (Life Technologies, Sao Paulo, Brasil).

Las condiciones de amplificación se establecieron como sigue: etapa de desnaturalización a 95 ° C durante 3 min seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 3 min; a 63 ° C durante 30 s; extensión a 72 ° C durante 40 s y una etapa de extensión final a 72 ° C durante 10 min. El ADN de las presas (*T. vaporariorum* o *E. eremicus*), el ADN de *G. punctipes* y agua destilada en autoclave se incluyeron como controles positivo y controles negativos, respectivamente.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en 1.5% geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Un depredador se consideró negativo si el ADN presa no se detectó después de dos amplificaciones independientes.

Los resultados fueron reportados como: proporción de los depredadores en la que la presa fue detectado (es decir, el número de depredadores con ADN presas / número total de depredadores analizados).

5.5.3 Especificidad y sensibilidad del cebador

Se realizaron ensayos para confirmar que no existiera reactividad cruzada de los cebadores y estos fueran específicos. Además, se realizaron dos análisis preliminares; el primero, para establecer el consumo mínimo de presas por parte del depredador, que podía ser detectado por análisis de PCR (Anexo 2); el segundo, para determinar el tiempo mínimo que permanecía sin degradarse el ADN de la presa en el tracto digestivo del depredador (Anexo 3).

Para establecer los límites de detección de cada cebador se realizaron amplificaciones siguiendo las condiciones previamente descritas utilizando diluciones seriadas (1:10 a 1:10000) de ADN presa (mosca o avispa). Además, se evaluó la sensibilidad de cada cebador en presencia de ADN no blanco, simulando las condiciones reales de estudio, donde encontramos una mayor proporción de ADN del depredador respecto al ADN blanco (presa). Para este ensayo, se realizaron amplificaciones de acuerdo a las condiciones descritas en la sección previa, de una muestra de ADN conformada por una proporción 10:1 de ADN de *G. punctipes*: ADN de presa (mosca o avispa).

6. Resultados

6.1 Efecto de la depredación de *G. punctipes* en las poblaciones de mosca blanca y avispa parasitoide en microcosmos

6.1.1 Sin presa alternativa

El promedio de ninfas de mosca blanca consumidas se muestra en la figura 3. Los porcentajes más altos se encontraron en el tratamiento 3 (NMB+A+G sim) que se corresponde con la aplicación simultánea de la avispa y el depredador. En el tratamiento 2 (NMB+G) donde solo se encontró como el enemigo natural a la chinche, el consumo fue significativamente menor, pero en mayor proporción que en el tratamiento 4 (NMB+A+G sec) donde se encontraban las ninfas parasitadas ($F_{(2,28)}= 107.90, P<0.05$).

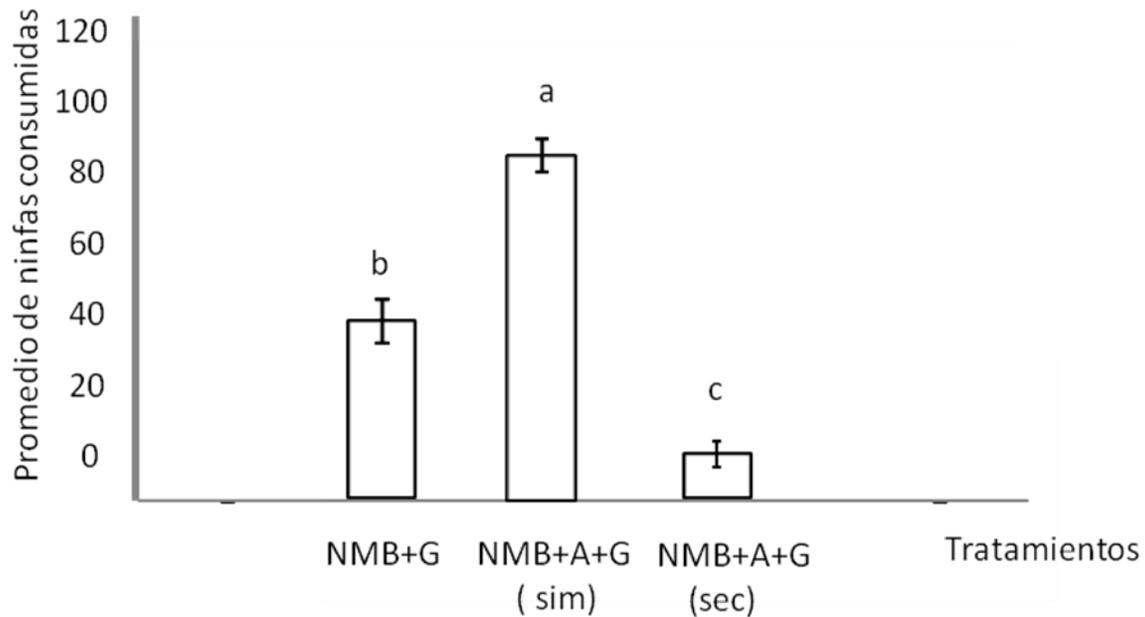


Figura 3: Número promedio de ninfas consumidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+G= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes*, NMB+A+G sim= Ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

El promedio de moscas emergidas se observa en la figura 4. Esta variable en el tratamiento de aplicación de enemigos naturales de forma simultánea (NMB+A+G sim) resultó estadísticamente diferente a los tratamientos control (NMB) donde solo se encontraba la plaga y a los tratamientos donde se aplicaron los enemigos naturales de forma independiente (tratamientos NMB+G y NMB+A respectivamente), ($F_{(4,48)}=10.648$, $P=0.00003$). Sin embargo, no se encontró diferencias en la emergencia de moscas entre los tratamientos de aplicación simultánea de enemigos naturales (NMB+A+G sim) y el tratamiento donde se aplicaron los mismos de forma secuencial (NMB+A+G sec).

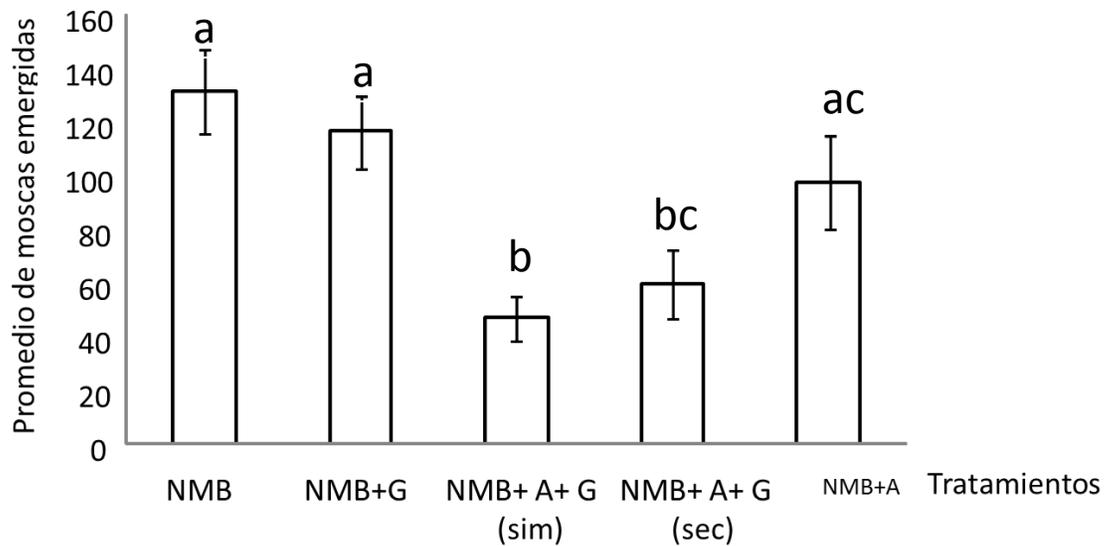


Figura 4: Número promedio de moscas emergidas en los micocosmos. Los tratamientos fueron: NMB= ninfas de mosca blanca, NMB+G= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes*, NMB+A+G sim= Ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial y NMB+ A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Al comparar el promedio de ninfas parasitadas en cada tratamiento, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas ($H_{(2, N=33)} = 22.35, P < 0.05$), con una disminución de ninfas parasitadas en el tratamiento (NMB+A+G sim) en relación al resto de los tratamientos (Figura 5).

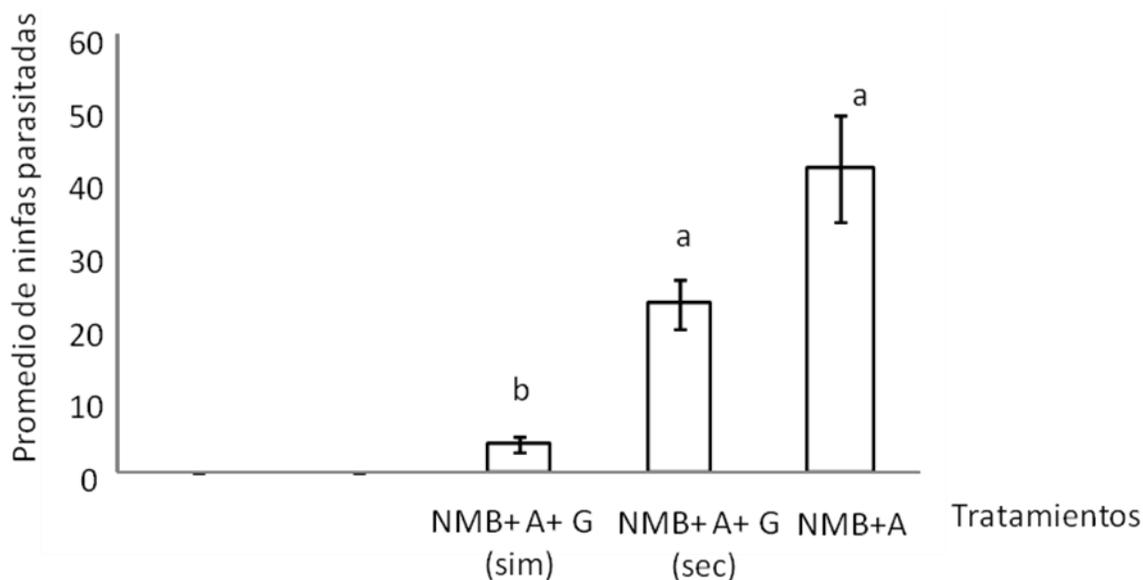


Figura 5: Número promedio de ninfas parasitadas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+A+G sim= Ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial y NMB+A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Este comportamiento fue similar al analizar las avispas adultas que emergieron en cada tratamiento, ya que cuando se aplicaron los enemigos naturales de forma simultánea (NMB+A+G sim) o secuencial (NMB+A+G sec), siempre emergieron menos avispas que en el tratamiento control (NMB+A) donde solo se encontraron las avispas parasitadas sin presencia del depredador ($H_{(2, N=33)}=21.873, P < 0.05$)(Figura 6).

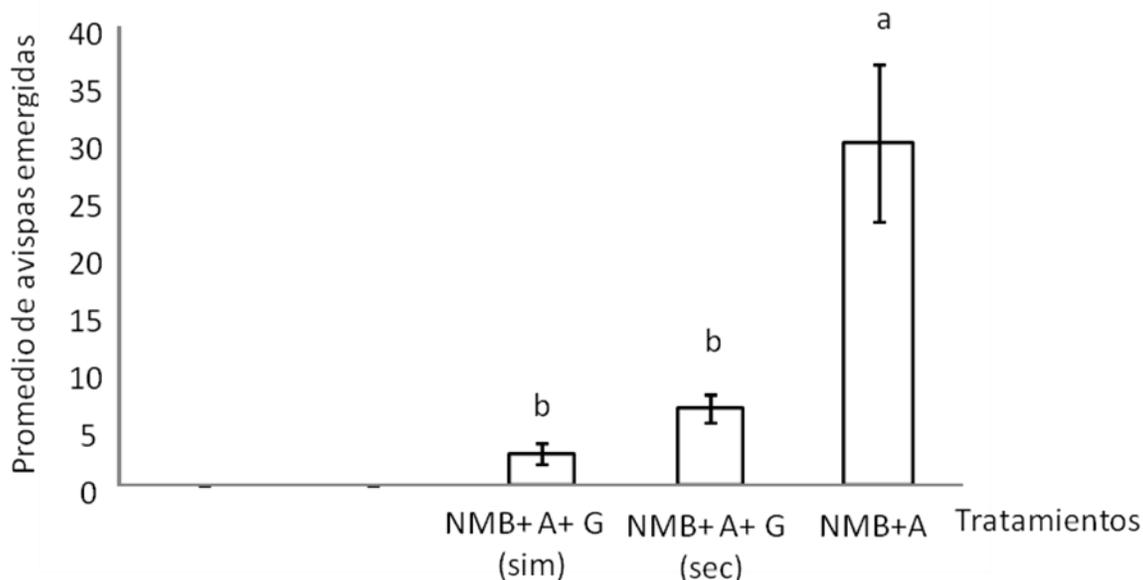


Figura 6: Número promedio de avispas emergidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+A+G sim= Ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial y NMB+ A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

6.1.2 Con presa alternativa

Al incluir otra presa herbívoro en la red trófica se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto al número promedio de ninfas consumidas, después de 48 horas de permanencia de los enemigos naturales en los microcosmos (Figura 7). Se observó que en los tratamientos de aplicación simultánea de enemigos naturales con pulgón (NMB+G+A+P (sim)) y sin pulgón ((NMB+G+A+P (sim))) hubo diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,31)}=18.75$, $P < 0.05$). Se observó una disminución en el consumo de NMB cuando otra presa alternativa estuvo presente en el sistema biológico.

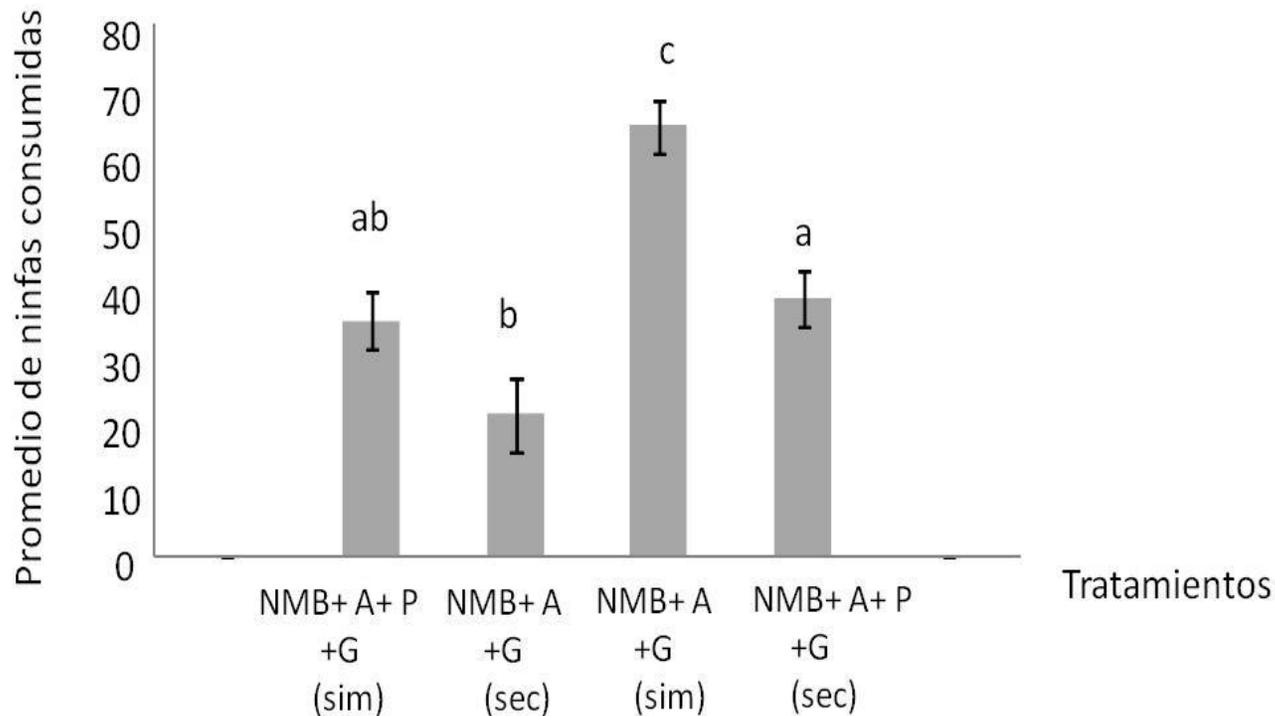


Figura 7: Número promedio de ninfas de mosca blanca consumidas en los tratamientos donde se encontraron los enemigos naturales en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+A+ P+G sim= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial; NMB+A+G sim= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea y NMB+A+ P+G sec= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

En los tratamientos de aplicación secuencial (NMB+G+A+P (sec)) y (NMB+G+A (sec)) también se evidencian diferencias en el consumo de NMB, con una tendencia a disminuir el consumo de esta plaga cuando la presa alternativa (pulgón) estuvo presente en el microcosmo.

Al analizar el número de moscas emergidas en cada tratamiento, (Figura 8) se observó que existían diferencias significativas solamente con el control (NMB), donde solo se

encontraban las ninfas de mosca blanca. De manera que la acción combinada o no de los enemigos naturales logró una disminución significativa, de las moscas emergidas tanto en los tratamientos con presa alternativa como en los tratamientos sin esta $F_{(6,55)}=34.94$, $P<0.05$.

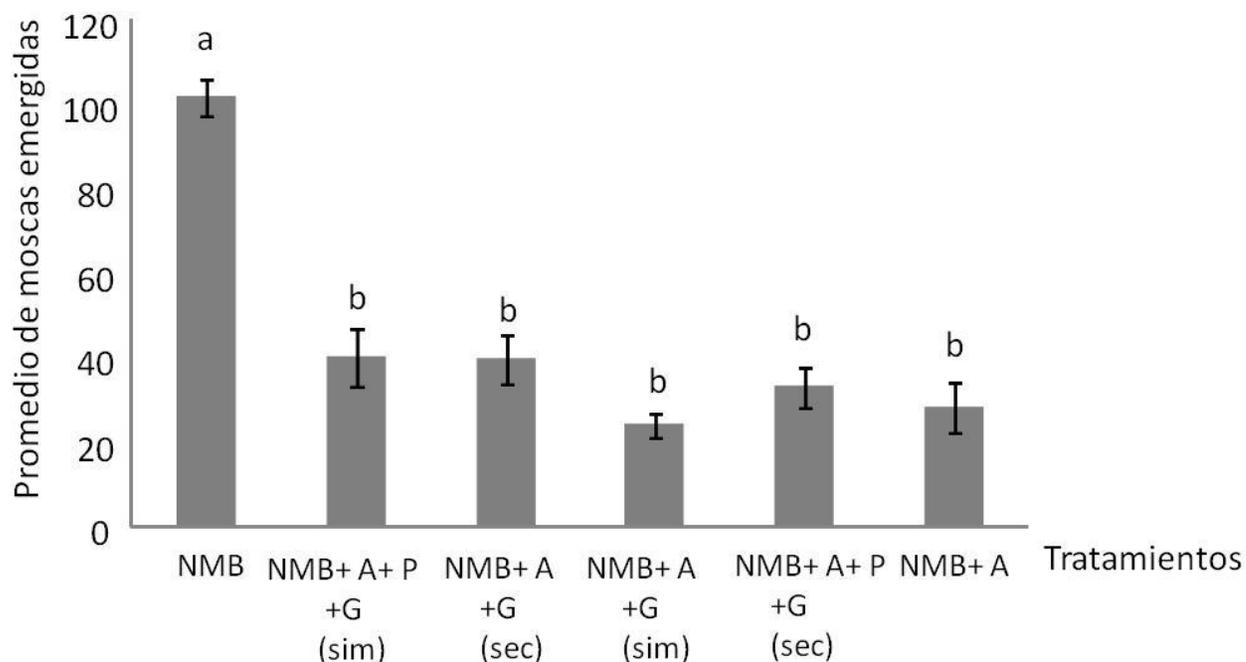


Figura 8: Número promedio de moscas emergidas en los microcosmos. Los tratamientos fueron: Los tratamientos fueron: NMB= ninfas de mosca blanca solamente, NMB+A+ P+G sim= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial; NMB+A+G sim= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sim= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial y NMB+A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P< 0.05$).

Al analizar el número promedio de pulgones que permanecieron en la planta sin ser depredados, (figura 9) se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de aplicación simultánea (NMB+P+G+A sim) y secuencial (NMB+P+A+G

sec) ($F_{(1,15)}=21.39$, $P=0.00033$) $t=4,7264$, $P=0.000228178$, de los pulgones no encontrados, $t= 8.1399$, $P= 4,425*10^{-7}$.

Se observó una mayor cantidad de pulgones en las planta de los microcosmos del tratamiento (NMB+P+G+A sim), donde ambos enemigos naturales se encontraron forrajeando por 48 horas simultáneamente, sin embargo en el tratamiento secuencial se encontraron menos pulgones vivos en la planta, lo que es una medida de que fueron consumidos mayormente que la presa primaria.

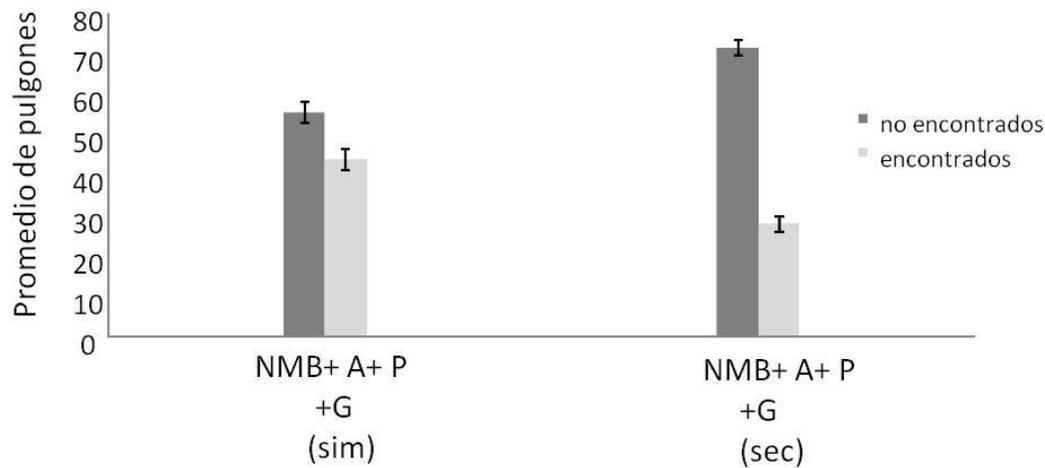


Figura 9: Número promedio de pulgones encontrados y no encontrados en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+A+G sim= Ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Las ninfas parasitadas también se evaluaron en cada microcosmo (Figura 10). En los únicos tratamientos donde se encontraron diferencias significativas ($H_{(4,N=45)}= 28.61$, $P < 0.05$). Se observó que a pesar de estas diferencias entre los tratamientos de aplicación simultánea y secuencial, ya fuera con presa alternativa o no, no existían diferencias en cuanto a la cantidad de ninfas parasitadas, sin embargo al analizar todos los tratamientos en conjunto se observa que el menor número de ninfas parasitadas está en el tratamiento (NMB+A+G sim).

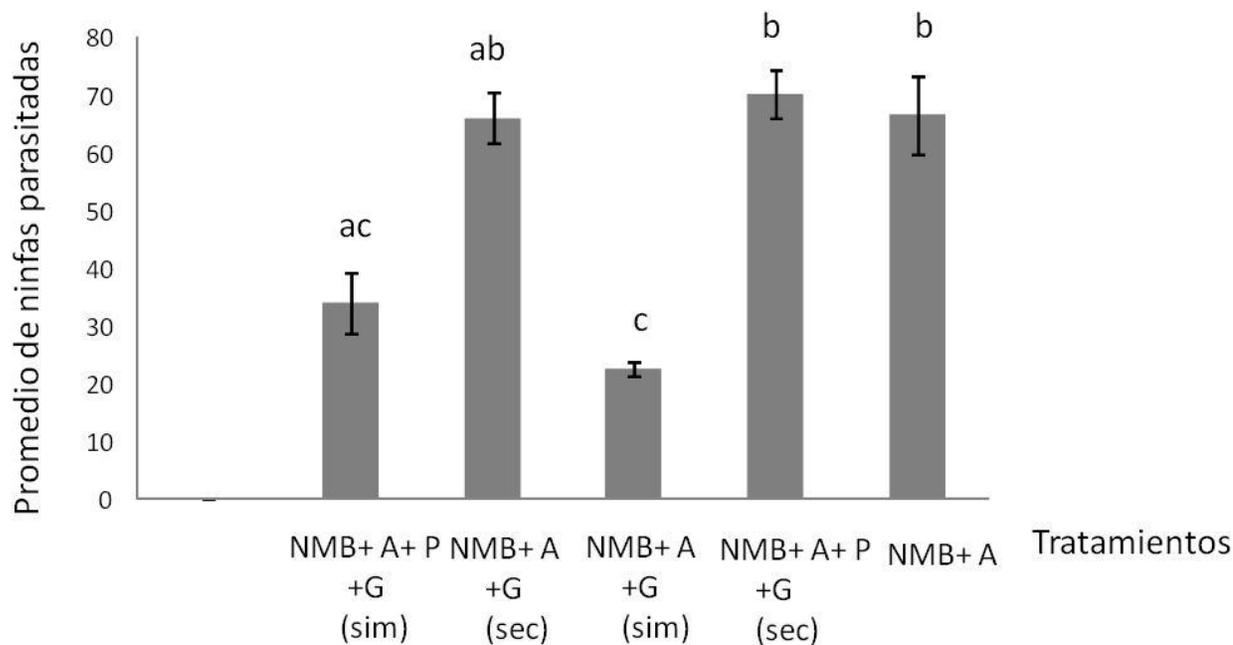


Figura 10: Número promedio de ninfas parasitadas en los tratamientos con los enemigos naturales en los microcosmos bioensayo 2. Los tratamientos fueron: NMB+A+P+G sim= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial; NMB+A+G sim=ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+ P+G sec= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial, y NMB+A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Por último se realizaron observaciones directas en el número de avispas emergidas en cada microcosmo (Figura 11). Esta variable resultó con diferencias estadísticamente significativas ($F_{(4,44)}=3.125, P= 0.0253$). Esta vez más se observó que en el tratamiento de aplicación secuencial (NMB+A+G sec) de enemigos naturales emergieron menos avispas que en el resto de los tratamientos, siendo el tratamiento (NMB+P+A+G sim), igual al control (NMB+A).

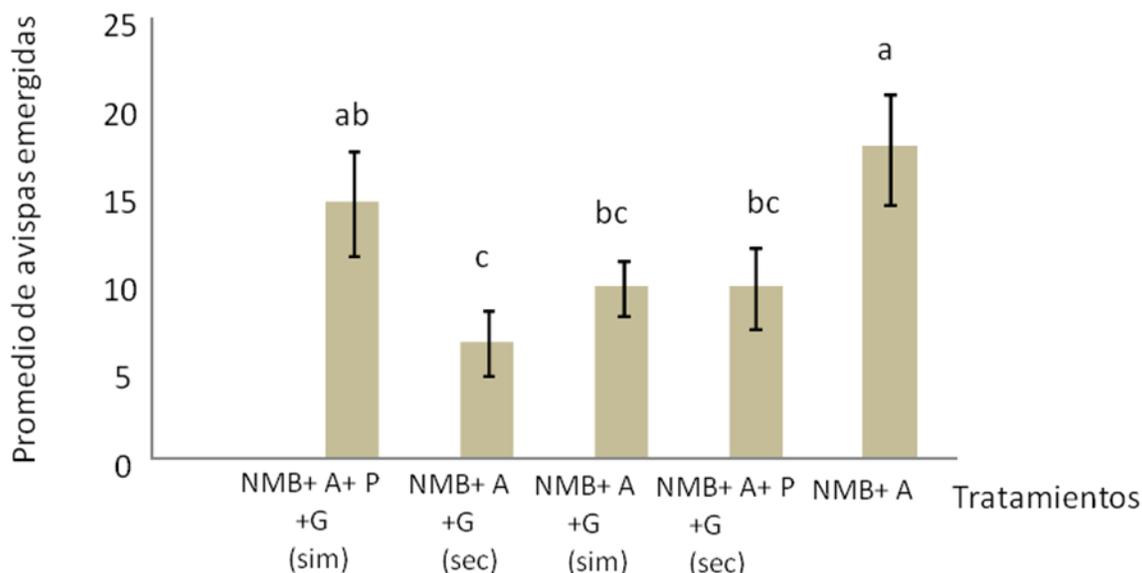


Figura 11: Número promedio de avispas emergidas en los tratamientos con la presencia de los enemigos naturales en los microcosmos. Los tratamientos fueron: NMB+A+ P+G sim= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea, NMB+A+G sec= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial; NMB+A+G sim= ninfas de mosca blanca en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación simultánea; NMB+A+ P+G sec= ninfas de mosca blanca y pulgón en combinación con *G. punctipes* y *E. eremicus*, aplicación secuencial y NMB+A= ninfas de mosca blanca y *E. eremicus*. Las barras representan el error estándar y letras iguales no difieren estadísticamente ($P=0.0235$).

6.2 Análisis molecular de los individuos de *G. punctipes* colectados del bioensayo 1 para la detección de las interacciones tróficas

Los cebadores analizados fueron específicos y sensibles para detectar cada presa en el tracto digestivo del depredador.

El porcentaje de detección molecular de las avispas en el tracto digestivo de la chinche, fue superior al 80%, mientras que la detección molecular de las moscas sobrepasa el 50%, sólo en el tratamiento (NMB+A+G sim,) donde ambos enemigos naturales interactuaron simultáneamente (Tabla 2). Se analizaron un total de 63 individuos en el tratamiento 2 (NMB+G), 58 individuos en el tratamiento 3(NMB+A+G sim) y 54 individuos en el

tratamiento 4(NMB+A+G sec). Solo se utilizaron estos individuos porque resultaron positivos en la extracción de ADN.

Tabla 2. Porcentaje de detección molecular de *E. eremicus* y *T. vaporariorum* en el tracto digestivo de *G. punctipes*, colectados de los microcosmos provenientes de los tratamientos con la aplicación de *G. punctipes* solamente (tratamiento 2), de la aplicación simultánea (tratamiento 3) y secuencial (tratamiento 4) de enemigos naturales.

Tratamientos	Número de <i>G. punctipes</i> analizados	Detección molecular de MB (%)	Detección molecular de Avispa (%)
NMB+G	63	38,10	
NMB+A+G (sim)	58	55,17	89,66
NMB+A+G (sec)	54		90,74

Ambas presas de la red trófica fueron detectadas por PCR en el tracto del depredador. La presa *E. eremicus* fue detectada un 89,66 % en el tratamiento donde ambos enemigos naturales interactuaron simultáneamente, mientras que en el tratamiento 4, donde *G. punctipes* interactuó solamente con las ninfas parasitadas de *E. eremicus*, se calculó un porcentaje de detección molecular de 90% (n=42).

La detección molecular de la mosca blanca fue calculada en todos los tratamientos donde los individuos de *G. punctipes* tuvieron acceso a su consumo. Los porcentajes de detección molecular resultaron menores que el de la avispa como presa, ya que en el tratamiento 2, el 38,10% de los depredadores resultaron positivos en la detección de ADN de mosca blanca y en el tratamiento 3, llegó a estimarse un 55,17 %.

7. Discusión

Los resultados del estudio mediante técnicas moleculares del tracto digestivo de la chinche depredadora *G. punctipes*, confirman que existe DIG de esta chinche sobre la avispa *E. eremicus* en condiciones de microcosmos, lo que refuerza los resultados de Velasco-Hernandez *et al.* (2013) los cuales muestran que el depredador consume estados inmóviles y móviles de la presa intragremial *Eretmocerus eremicus*, pero en condiciones de laboratorio. Los estados móviles de este bioensayo (tratamiento (NMB+A+G sim)) se corresponden con los adultos de la avispa parasitoide, los cuales estuvieron de forma simultánea con el depredador 48h. por lo tanto es muy probable que el ADN detectado en el tracto digestivo del depredador provenga de los adultos liberados y no de los estados inmaduros del parasitoide en ese tratamiento; ya que el huevo del parasitoide es ovipositado externamente a la ninfa de mosca blanca y la introducción a este huésped puede tomar 2 o más días después que emerge la larva del parasitoide (Gerling, 1990).

El consumo de adultos puede estar relacionado con el movimiento, ya que se ha observado que *Geocoris punctipes* muestra preferencia por presas móviles (Eubanks y Denno, 2000), es quizá por ello que se detecta ADN de adultos de *E. eremicus* en el tracto digestivo del depredador, ya que son presas móviles que coinciden espacialmente con el depredador, compartiendo el mismo recurso. Los resultados de ADN muestran también que además de ser positiva la detección molecular de la avispa en el tracto del depredador, este porcentaje es alto lo que sugiere que ambos enemigos naturales no pueden coexistir, como ha sucedido en otros casos donde se ha detectado depredación intragremial en condiciones semi-naturales (Pochubay y Grieshop, 2012), ya que representa una fuente adicional de mortalidad en la población del parasitoide y esto puede tener efectos negativos sobre la dinámica y abundancia de las poblaciones del parasitoide en futuras generaciones (Naranjo, 2007).

Por otra parte, además de detectar que existe depredación intragremial sobre adultos a través de las técnicas moleculares, también se detectaron depredadores con ADN de las ninfas de mosca blanca sin parasitar y ninfas de mosca blanca parasitadas (estados inmaduros de *E. eremicus*) en su tracto digestivo. Ambos tipos de ninfas permanecen

inmóviles en las hojas y al parecer no hay limitación física que impida la penetración y digestión del contenido de las mismas, ya sea incluso el consumo del parasitoide dentro de la cutícula del huésped, por parte de *Geocoris punctipes* (Naranjo, 2007).

Sin duda, las técnicas moleculares empleadas en el bioensayo 1 permitieron complementar las observaciones que se realizaron en los microcosmos, en cuanto al efecto de *G. punctipes* en las poblaciones de la mosca blanca y la avispa. Según Moreno-Ripoll *et al.* (2012), las técnicas moleculares son de gran importancia porque contribuyen a identificar qué especie fue consumida por el depredador, lo cual era imposible utilizando herramientas tradicionales como las observaciones directas en condiciones naturales y semi-naturales.

Por otra parte, en el bioensayo 1, al analizar el efecto de *G. punctipes* sobre las poblaciones de las moscas blancas y las avispas en condiciones semi-naturales, se podría decir que ocurrió más depredación sobre NMB cuando ambos enemigos estuvieron de forma simultánea (NMB+A+G sim) que cuando estuvo el depredador solo (NMB+G). Según Malo *et al.* (2012) en plantas de jitomate cuando se combinan el parasitoide *Eretmocerus mundus* y el depredador *Macrolophus pygmaeus*, ocurre mayor depredación de ninfas de mosca blanca, que cuando el depredador actúa solo, similar a lo que observamos en nuestro bioensayo.

Esta conducta alimentaria, puede estar relacionada con la presencia de las avispas adultas, las cuales pueden dejar señales semio-químicas. Estas señales pueden ser rastros dejados por las avispas mientras caminan, parasitan o se alimentan del huésped (Godfray 1994; van Baaren *et al.*, 1994; Jervis y Kidd 1986) y que pueden ser detectadas por el depredador (Faraji *et al.*, 2000; Argawala *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2000).

Es necesario recordar que *G. punctipes* es un depredador generalista, por lo que puede consumir diferentes especies, incluso se ha reportado que se puede alimentar de la planta (Tillman y Mullinix, 2003) Las plantas pueden interactuar directa o indirectamente con los enemigos naturales de los herbívoros. La calidad de la planta, emisión de toxinas, pelos, arquitectura, la inducción de volátiles por los herbívoros, son algunas de las características que afectan la DIG (Gillespie y Roisenberg, 2010).

Según Tillman y Mullinix (2003), los individuos de *G. punctipes*, se alimentan en gran medida de las plantas, no obstante cuando existen presas disponibles, disminuye el consumo de la savia de la planta y se alimentan en mayor medida de las presas. En nuestro caso, posiblemente el depredador se alimentó de la planta principalmente en el tratamiento (NMB+G) donde solo tuvo como presa disponible a las ninfas de mosca blanca. Sin embargo, en el tratamiento (NMB+A+G sim), nuestra hipótesis es, que al aumentar la densidad de las presas disponibles (avispa y ninfas de mosca blanca), aumentó el consumo de las mismas y disminuyó el de la planta. Además, se ha descrito que *Geocoris* spp. parece alimentarse de las presas en relación a la abundancia de las mismas, por lo que el aumento del número de presas provoca un aumento en la tasa de consumo (Koss *et al.*, 2004) o esto también puede suceder como respuesta a la presión de competencia ejercida por la avispa (McCoy *et al.*, 2012; Sura y Mahon, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, también resulta interesante el efecto de la aplicación simultánea y secuencial de los enemigos naturales en la emergencia de moscas blancas en cada tratamiento; ya que a pesar de existir DIG, las observaciones en cada microcosmo permitieron detectar una disminución significativa en la emergencia de las moscas blancas, lo cual sugiere que la efectividad de los enemigos naturales, como agentes de control biológico, no se ve disminuida a pesar de que existe DIG en condiciones de microcosmos, en un periodo corto de interacción de 48h.

Este es un caso que demuestra que la existencia de la depredación intragremial entre enemigos naturales no siempre tiene un efecto negativo en el control biológico. Según Rosenheim y Harmon (2010) la adición de un depredador intragremial al sistema trófico, tiene varios efectos en las poblaciones de herbívoros, o sea que en algunos casos se observa dramático detrimento de las poblaciones de la plaga, mientras en otros casos se observa una explosión de la plaga, contrario a la idea del modelo de depredación intragremial clásico que sugiere que siempre ocurre una disrupción del control biológico.

Además del efecto en la disminución de la población de moscas blancas, se observó un detrimento significativo en la cantidad de ninfas parasitadas así como en la emergencia de avispa en los tratamientos con la combinación simultánea (NMB+A+G sim) y secuencial

(NMB+A+G sec) de enemigos naturales. Este aspecto es similar al evaluado por Malo *et al.* (2012), quien detectó en plantas de algodón que el número de ninfas parasitadas, cuando solo estaban presentes las hembras de *Eretmocerus mundus*, fue mayor que cuando el parasitoide fue liberado junto al depredador *M. pygmaeus*.

Según Heimpel *et al.* (1997) en un estudio en condiciones naturales, explica que la depredación intensiva provoca que los parasitoides no desarrollen al máximo su potencial de fecundidad, por lo que se afecta el éxito reproductivo de los parasitoides. En nuestro estudio, se evidencia una disminución de las ninfas parasitadas y de la emergencia de avispas en los tratamientos con la aplicación simultánea y secuencial del depredador, a diferencia del tratamiento control donde solo estuvieron las avispas, demostrándose una disminución del éxito reproductivo del parasitoide.

Según Rosenheim y Harmon (2010) el depredador puede que tenga todas las ventajas sobre el depredador intermediario (puede ser el mejor competidor) y por lo tanto es el mejor controlador biológico, al mismo tiempo de que es capaz de explotar al depredador intermediario como una fuente de alimento. En este caso no sorprendería que adicionar un depredador intragremial podría mejorar el control del herbívoro, ya que aprovecha al máximo todos los recursos del medio (la plaga y la presa intragremial). Esta hipótesis puede ser explicada a través de nuestra investigación, ya que notamos una disminución en la población de la avispa (presa intragremial), al mismo tiempo que una disminución en la población del herbívoro plaga (mosca blanca), producto del efecto del depredador intragremial *G. punctipes*.

La DIG se ha observado en otros estudios mediante métodos moleculares, con un efecto de la disminución de la población plaga. Es el caso del estudio realizado por Moreno-Ripoll *et al.* (2012), quien observó que en el sistema de *B. tabaci*, la avispa parasitoide *Eretmocerus mundus* y los depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*, se enfrascaban en relaciones de DIG, aunque el porcentaje de detección molecular del parasitoide fue más bajo que el detectado en este estudio (23.3% y 39.3% de detección molecular de *E. mundus* en cada depredador) y los depredadores se alimentaron mayormente de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (76.7% y 60.7% de detección molecular de la mosca blanca en cada

depredador) pero a pesar de detectar DIG, los depredadores no dejaron de consumir la plaga *Bemisia tabaci*, en condiciones de invernadero.

El estudio de Malo *et al.* (2012) basado en observaciones directas demuestra que existe depredación intragremial de *M. pygmaeus* sobre *E.mundus* en todas las etapas de desarrollo del parasitoide, lo que provoca una reducción de la cantidad de individuos de esta especie, similar a lo detectado en nuestro estudio. La única diferencia es que además de observaciones de las plantas en el microcosmo, realizamos estudios moleculares donde se confirma el consumo del parasitoide *E. eremicus* por parte de *G. punctipes*.

En el caso del bioensayo 2 donde se introdujo una presa alternativa en el sistema trófico, se detectó que el número de ninfas de mosca blanca consumidas disminuyó en el tratamiento donde la presa alternativa *M. persicae* estaba presente y a la vez, ocurría una interacción simultánea de enemigos naturales (tratamiento NMB+P+A+G sim), a diferencia del tratamiento sin presa alternativa (NMB+A+G sim). De alguna forma la presencia del pulgón influyó en la conducta alimentaria de *G. punctipes*. En otros estudios se ha observado comportamientos similares, por ejemplo Koss y Snyder (2005) detectaron que cuando el pulgón *M. persicae* estaba presente en combinación con huevos de *Leptinotarsa deselineata* (Say) se limitó la fortaleza de la interacción trófica con la presa primaria (huevos de *Leptinotarsa deselineata*) (Koss y Snyder, 2005) y el depredador consumió preferentemente la presa alternativa.

Sin embargo, Koss *et al.* (2004), en un estudio similar pero invirtiendo los roles de presa primaria y alternativa siguió notando una preferencia por el consumo de la presa primaria, que en ese caso fue el pulgón *Myzus persicae*, a pesar de la introducción de los huevos de *Leptinotarsa deselineata* como presa alternativa. En resumen se muestra una preferencia del depredador *Geocoris* spp por ingerir a los pulgones. En nuestro estudio no contamos los pulgones depredados, sin embargo estimamos esta cantidad a partir de los pulgones que permanecieron en la planta. Al analizar estos datos notamos que en el tratamiento (NMB+P+A+G sim) permanecen menos pulgones en la planta y hay menos consumo de NMB, lo que podría dar una idea de que los individuos de *G. punctipes* casi no se alimentaron de las NMB, producto quizás de la presencia de los pulgones.

La chinche ataca preferentemente pulgones en presencia de otras presas (Koss *et al.*, 2004; Eubanks y Denno, 2000), debido quizás a que este depredador se orienta visualmente y reacciona a la presencia de presas móviles más rápido que a la presencia de presas inmóviles (Eubanks y Denno, 2000), como hemos descrito anteriormente.

A pesar de que disminuye el consumo de ninfas de mosca blanca cuando el pulgón está presente, la emergencia de mosca blanca en todos los tratamientos (con la combinación o no de enemigos naturales) fue menos que en el control (NMB) donde solo estuvo la plaga. Por lo que no se evidencia una interrupción del control biológico sobre la misma por la presencia de una presa alternativa.

Según Messelink *et al.* (2013), la liberación simultánea del depredador intragremial *O. majusculus* con el parasitoide *A. colemani*, en presencia de *Frankliniella occidentalis* (presa primaria) y *Myzus persicae* (presa alternativa), mejora el control biológico, o mejor dicho no se provoca una interrupción del control biológico, de manera que ambas presas (*F. occidentalis* y *M. persicae*) son fuertemente controlados en todos los tratamientos. Similar a lo que sucede en nuestro estudio, ya que la chinche consume ambas presas en la red trófica por lo que no hay una interrupción del control biológico de la mosca blanca a pesar de existir DIG.

Algo también interesante, es que en nuestro bioensayo 2, ocurre una liberación de la presión de consumo de la presa intragremial, cuando la presa alternativa está presente. Este resultado es similar al encontrado por Pérez-Ascencio, (2014), quien describió que después de 48h de consumo, la chinche *G. punctipes* consume menos presa intragremial (ninfas parasitadas de mosca blanca, por *E. eremicus*) en presencia de diferentes densidades del pulgón *M. persicae*, en condiciones de laboratorio.

A pesar de que nuestro estudio se realizó en condiciones semi-naturales, donde no se puede detectar todo el conjunto de interacciones tróficas del depredador, resulta de vital importancia, ya que se puede determinar en una escala de tiempo corta el tipo de interacción que puede existir si llegaran a coincidir ambos enemigos naturales en un cultivo agrícola. Según Janssen *et al.* (2010), es una necesidad realizar estudios en escalas de

tiempo corta que expliquen una dinámica transiente en modelos biológicos con DIG, ya que muchos cultivos agrícolas tienen ciclos de producción cortos y en un sistema para alcanzar el equilibrio poblacional se requiere de un tiempo superior a lo que duran los cultivos en el campo.

Nuestros resultados evidencian la alta probabilidad de ocurrencia de depredación intragremial entre los enemigos naturales *G. punctipes* y *E. eremicus*, cuando se aplican para el control de la mosca blanca de forma simultánea o secuencial. Por lo que se necesitan más investigaciones en este campo de las interacciones tróficas entre los agentes de control biológico y cómo estas influyen en el control de la proliferación de la población plaga, en otras escalas espaciales y temporales. El entendimiento de estas interacciones será vital para un manejo integrado de plagas exitoso.

8. Conclusiones

1. Los individuos de *G. punctipes* presentan altos porcentajes de detección molecular de la avispa *E. eremicus* en su tracto digestivo (i.e ocurre depredación intragremial).
2. Los individuos de *G. punctipes* contienen ADN de *T. vaporariorum* en su tracto digestivo en mayor medida cuando se aplican simultáneamente con la avispa *E. eremicus* (i.e. consumen *T. vaporariorum*).
3. En presencia de los enemigos naturales *E. eremicus* y *G. punctipes*, actuando de forma simultánea o secuencial, ocurre una disminución en la población de la avispa (presa intragremial), al mismo tiempo que una disminución en la población de la mosca blanca (*T. vaporariorum*).
4. En presencia de una presa alternativa, *Mizus persicae*, existe depredación intragremial sobre la avispa *E. eremicus*, por parte del depredador *G. punctipes*, a pesar de que se notó una disminución en el número de pulgones encontrados en la planta luego de añadir dicho depredador.
5. La presencia de una presa alternativa, el pulgón *Myzus persicae*, no provoca una disrupción en el control biológico de la presa primaria *T. vaporariorum*, ya que el depredador generalista *G. punctipes* continuó el consumo de esta presa.

9. Referencias bibliográficas

- Aebi, A., Brown, P.M.J., De clerq, P. Hautier, L., Howe, A., Ingels, B., Ravn., H.P., Sloggett, J.J., Zindel, R., Thomas, A. (2011). Detecting intraguild predation in the field. *Biocontrol*. 56: 429-440.
- Agustí, N., Shayler, J., Harwood, I., Vaughan, K., Sunderland, K.D. y Symondson, W. (2003). Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*. 12: 3467-3475.
- Argawala, B.K, Yasuda, H., Kajita, Y. (2003). Effect of conspecific and heterospecific feces on foraging and oviposition of two predatory ladybirds: Role of fecal cues in predator avoidance. *Journal of Quimical Ecology*. 29. (2): 357-376.
- Arnó, J., Moliner, J., Gabarra, R. (1994). Control integrado de plagas en invernaderos de tomate temprano en la Isla Menorca. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 20: 501-509.
- Asplen, M.K., Bellamy, D.E., Byrne, D.N. (2001). Eggs of *Eretmocerus eremicus*, a whitefly parasitoid. Department of Entomology, The University of Arizona, Vegetable Report. 1–3.
- Azab, A.K., Megahed, M.M., El Mirsawi, D.H. (1971). On the biology of *Bemisia tabaci* 12 (Genn.). *Bulletin Society Entomological Egypte*. (55): 305-15.
- Badii, M.H. & Abreu, J.L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de 16 plagas. *International Journal of Good Consience*. (1): 82-89.
- Bai, Y. & Lindhout, P. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*. 100: 1085–1094.
- Barbosa, L., Freire, C., Machad, A., de Souza, B., de Paula Batista, E.S. (2011). Tabelas de esperança de vida e fertilidade de *Myzus persicae* sobre pimentão em laboratório e casa de vegetação. *Bragantia, Campinas*. 70. (2): 375-382.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2011). Additions and amendments to "Aphids on the World's Plants". *Zootaxa*. 2774: 57-68.
- Bonsall, M.B. & Holt R.D. (1992). The effect of enrichment on the dynamics of aparente competitive interactions in stage- structured systems. *American Naturalist*. 162: 780-795.

- Byrne D.N. & Bellows T.S. (1991). Whitefly biology. *Annual Review Entomology*. (36): 431-574.
- Carapia Ruiz, V. E. & Castillo-Gutiérrez, A. (2013). Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 29. (1): 178-193.
- Cardona, C., Rodríguez, I., Bueno, J., Tapia, X. (2005). Biología y manejo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en habichuela y frijol. Publicación Ciat 345. ISBN 958-694-079-9. Colombia. 50p.
- Castañé, C., Alomar, O., Goula, M., Gabarra, R. (2004). Colonization of tomato greenhouses by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. *Biological Control*. 30: 591–597.
- Cenis, J.L., Pérez, P., Fereres, A. (1993). Identification of aphids (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of Entomological Society of America*. (86): 545-550.
- Chailleux, A., Bearez, P., Pizzol, J., Amiens-Desneux, E., Ramirez-Romero, R., Desneux, N. (2013). Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta*. *Journal of pest science*. DOI 10.1007/s10340-013-0498-6.
- Champlain, R.A. & Sholdt, L.L. (1967). Life history of *Geocoris punctipes* (Hemiptera: 21 Lygaeidae) in the Laboratory. *Annual Entomological Society America*. (60): 881–883.
- Choh, Y., van der Hammen, T., Sabelis, M., Janssen, A. (2010). Cues of intraguild predators affect the distribution of intraguild prey. *Oecologia*, 163: 335-340.
- Cohen, A.C. (1985). *Geocoris punctipes* as a predator of *Bemisia tabaci*: A laboratory evaluation. *Entomologia experimentalis et applicata*. 64: 195-202.
- Crocker, R.L. & Whitcomb, W.H. (1980). Feeding Niches of the Big-Eyed Bugs *Geocoris bullatus*, *G. punctipes*, and *G. uliginosus* (Hemiptera: Lygaeidae: Geocorinae). *Environmental Entomology*. (9): 508-513.
- De Barro, P.J., Hart, P.J., Morton, R. (2000). The biology of two *Eretmocerus* spp. (Haldeman) and three *Encarsia* spp. (Hymenoptera: Aphelinidae) Forster and their potential as biological control agents of *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *Entomological Experimental Applied*. 94: 93–102.

- Díaz, M.A., Cantor, F., Rodríguez, D. (2012). Análisis estadístico de la producción de un biocontrolador de la mosca blanca en plantas de frijol bajo invernadero. *Communication Estadística*. 4: 95- 106.
- Eubanks, M. & Denno, R. (2000). Health food versus fast food: The effect of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecological Entomology*. 25:140-146.
- FAOSTAT. (2010). Consultado [3-11-2012]. Disponible en: <http://www.fao.org>.
- Faraji, F., Janssen, A., Van Rijn, P.C.J, Sabelis, M.W.(2000). Kin recognition by the predatory mite *Iphiseius degenerans*: discrimination among own, conspecific, and heterospecific eggs. *Ecological Entomology*. 25 (2): 147-155.
- Fréchette, B., Rojo, S., Alomar, O., Lucas, E. (2007). Intraguild predation between syrphids and mirids: who is the prey? Who is the predator? *Biocontrol*. 52: 175-191.
- Gagnon, A.E, Heimpel, G.E, Brodeur, J. (2011). The ubiquity of intraguild predation among predatory arthropods. *Plos one*. 6(11):e28061. Doi 10.1371/journal.pone.0028061.
- Gagnon, A.E., Doyon, S.J., Heimpel, G.E., Brodeur, J. (2001). Prey DNA detection success following digestion by intraguild predators: influence of prey and predator species. *Molecular Ecology Resources*. 11: 1022-1032.
- Gameel, O.I. (1974). Some aspects of the mating and oviposition behaviour of the cotton whiteny *Bemisia tabaci* (Genn.). *Revista Zoologic Africana*. 88: 784-88.
- Gardiner, M.M. & Landis, D.A. (2007). Impact of intraguild predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), biological control in cage studies. *Biological Control*. 40: 386-395.
- Gerling, D. (1990). Natural enemies of whiteflies: predators and parasitoids. in *Whiteflies, their bionomics, pest status and management*, ed. by Gerling D, Intercept, Andover, UK, pp. 147–186 .
- Gerling, D., Alomar, O., Arno, J. (2001). Biological control of *Bemisia* using predators and parasitoids. *Crop Protection*. 20: 779–799.
- Gillespie, D. R. & Roitberg, B.D. (2010) Interguild influences on intraguild predation in plant-feeding omnivorous.p:71-101. En: *Trophic and guild interaction in biological control*. Ed: J. Brodeur y G. Bouvin. Springer. The Netherlands. 241p.
- Godfray, H.C.J. (1994). *Parasitoids*. Princeton University Press, New Jersey, USA.

- Greenberg, S.M., Jones, W.A., Liu, T-X. 2002. Interactions Among Two Species of *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae), Two Species of Whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae), and Tomato. *Environmental Entomology*. 31(2): 397-402.
- Guershon, M. & Gerling, D.(1999). Predatory behavior of *Delphastus pusillus* in relation to the phenotypic plasticity of *Bemisia tabaci* nymphs. *Entomologia experimentalis et applicata*. 92: 239-248.
- Hagler, J.R., Jackson, C.G., Isaacs, R., Machtley, S.A. (2004). Foraging behavior and prey interactions by a guild of predators on various lifestages of *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Science*. 4: 1-13.
- Headrick, D.H., Bellows, T.S. Jr., Perring, T.M. (1996). Behaviors of female *Eretmocerus* sp. nr. *californicus* (Hym.Aphelinidae) attacking *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton, *Gossypium hirsutum*, (Malvaceae) and melon, *Cucumis melo* (Cucurbitaceae). *Biological Control*. 6: 64–75.
- Heimpel, G.E., Rosenheim *et al.*, J.A., Mangel, M. (1997). Predation on adult aphytis parasitoids in the field. *Oecologia*. 110: 346-352
- Holt, R.D. & Polis, G.A. (1997). A theoretical framework for intraguild predation. *American Nature*. 149: 795-764.
- Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. (2001).PCR based gut content analyses of insect predators:using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*. 10: 2059-2067.
- Hyndeyana, D., Meyhofer, R., Scholz, D., Poehling, H.M. (2001). Intraguild predation among the hoverfly *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae) and other aphidophagous predators. *Biological control*. 20:236-246.
- Janssen, A., Monserrat, M., Hillerislambers, R., de Ross, A.M., Pallini, A., Sabelis, M.W. (2010). Itraguild predation usually does not disrupt biological control. In: Brodeur, J., Boivin eds, p: 21-44. *Trophic and guild interactions in biological control*. Springer, Dordecht, The Netherlands. 241p.
- Janssen, A., Sabelis M.W., Magalhañes, S., Montserrat M., van der Hammen T. (2007). Habitat structure affects intraguild predation. *Ecology*. 88: 2713-2719.
- Jervis, M.A. & Kidd, N.A.C. (1986). Host-feeding strategies in hymemopteran parasitoids. *Biological Reviews*. 61: 395-434.

- Koss, A.M., Chang, G.C., Snyder, W.E. (2004). Predation of green peach aphids by generalist predators in the presence of alternative, Colorado potato beetle egg prey. *Biological Control*. 31:237-244.
- Koss, A.M. & Snyder, W.E. (2005). Alternative prey disrupt biocontrol by a guild of generalist predators. *Biological Control*. 32: 243-251.
- Kutuk, H., Yigit, A., Alaaglu, O. (2011). Intraguild predation of *Serangium parcesetosum* (Coleoptera:Coccinellidae) on whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) parasitized by *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera:Aphelinidae). *Biocontrol Science and Technology*. 21 (8): 982-985.
- Lawton, J. H. (1995). Ecological experiments with model systems. *Science*. 269: 328–331.
- Leite, G.L.D, Picanço, M., Jham, G.N., Ecole, C.C. (2002). Effect of leaf characteristics, natural enemies and climatic conditions on the intensities of *Myzus persicae* and *Frankliniella schulzei* attacks on *Lycopersicon esculentum*. *Arquivo do Instituto Biológico*. 69. (4): 71-82.
- López-Ávila, A., Cardona, M.C., García, G.J., Rendón, F. & Hernández, P. (2011). Reconocimiento e identificación de enemigos naturales de las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*. 27: 137-141.
- Lucas, E. & Rosenheim., J.A. (2011). Influence of extraguild prey density on intraguild predation by heteropteran predators: A review of the evidence and a case study. *Biological Control*. 59: 61-67.
- Lucas, E., Coderre, D., Brodeur, J. (1998). Intraguild predation among aphids predators: Characterization and influence of extraguild prey density. *Ecology*. 79(3): 1084-1092.
- Madsen, N., Terkildsen, S. Toft. (2004). Microcosm studies on control of aphids by generalist arthropod predators: Effects of alternative prey. *BioControl*. 49: 483–504.
- Malo, S., Arnó, J., Gabarra, R. (2012). Intraguild interactions between the predator *Macrolophus pygmaeus* and the parasitoid *Eretmocerus mundus*, natural enemies of *Bemisia tabaci*. *Biocontrol Science Technology*. 22: 1059-1073.
- Marques, F.D.M., Elfresh, M.C., Millar, J.G. (2000). Female produced sex pheromone of the predatory bug *Geocoris punctipes*. *Journal Chemical Ecology*. 26: 2843–2855.

- Martinou, A.F., Raymond, B., Milonas, P.G., Wright, D.J. (2010). Impact of intraguild predation on parasitoid foraging behavior. *Ecological Entomology*. 35: 183-189.
- McCann, K. (2000). The diversity –stability debate. *Nature*. 405: 228-233.
- McCoy, M.W., Stier, A.C., Osenberg, C.W. (2012). Emergent effects of multiple predators on prey survival: the importance of depletion and the functional response. *Ecological Letters*. 15: 1449-1456.
- Meisner, M., Harmon, J., Harvey, Ch.T. Elves, A.R.(2011).Intraguild predation on the parasitoid *Aphidus ervi* by the generalist predator *Harmonia axyridis*: the threat and its avoidance. *Entomologia experimentalis et applicata*. 138:193-201.
- Messelink, G.J, Bloemhard, Ch.M.J. Sabelis, M., Janssen, A. (2013). Biological control of aphids in the presence of thrips and their enemies. *Biocontrol*. 58: 45-55.
- Meyling, N.V., Enkergaard, A., Brodsgaar, H.F. (2004).Intraguild predation by *Anthocoris nemorum* (Heteroptera: Anthocoridae) on the aphid parasitoid *Aphidus colemani* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Science Technology*. 14(6): 627-630.
- Montemayor, C.O. & Cave, R.D. (2012). Evaluation of the predation capacity of *Posidius maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Microtheca ochroloma* (Coleoptera: Chrysomelidae) in field cages. *Journal of Economic Entomology*.105. (5): 1719-1725.
- Moreno-Ripoll, R., Agusti, N., Berruezo, R., Gabarra, R. (2012). Trophic relationships between predators' whiteflies and their parasitoids in tomato greenhouses: a molecular approach. *Bulletin of Entomological Research*. 102: 415-423.
- Moreno-Ripoll, R. ,R. Gabarra, W. O.C. Symondson , R. A. King , N. Agustí. (2014). Do the interactions among natural enemies compromise the biological control of the whitefly *Bemisia tabaci*? *Journal of Pest Science*. 87: 137-141.
- Nakashima, Y., Birkett, M.A., Pye, B.J., Pickett, J.A., Powell, W. (2004). The role of semiochemicals in the avoidance of the seven-spot ladybird, *Coccinella septempunctata*, by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology*. 30: 1103–1116.
- Naranjo, S. E. 1987. Observations on *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) Oviposition Site Preferences. *The Florida Entomologist*. 70 (1): 173-175.
- Naranjo, S.E. (2007). Intraguild predation on *Eretmocerus sp.nr. emiratos*, a parasitoid of *Bemisia tabaci*, by three generalist predators whit implications for estimating the

level and impact of parasitism. *Biocontrol Science and Technology*. 17(5/6): 605-622.

Naranjo, S.E., Cañas, L.A., Ellsworth, P.C. (2004). Mortalidad de *Bemisia tabaci* en un sistema de cultivos múltiples. *Horticultura Internacional*.14-21.

Peralta, I. E., Knapp, S., Spooner, D. M. (2006). Nomenclature for Wild and Cultivated Tomatoes. Report of the Tomato Genetics Cooperative. 56: 6-12.

Pérez-Ascencio, D. (2014). Respuesta funcional y numérica del depredador *Geocoris punctipes* en presencia de una presa adicional en un contexto de depredación intragremial. Tesis de Maestría. CUCBA. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 65p.

Pochubay, E.A. & Grieshop, M.J. (2012). Intraguild predation of *Neoseiulus cucumeris* by *Stratiolaelaps miles* and *Atheta coriaria* in greenhouse open rearing systems. *Biological Control*.63 (2): 195-200.

Polis, G.A. & Holt, R.D. (1992). Intraguild predation- the dynamics of complex trophic interactions. *Trends in ecology and evolution*.7: 151-154.

Polis, G.A., Myer C.A., Holt, R.D. (1989). The ecology and evolution of intraguild predation: potencial competitors that eat each other. *Annual review Ecology System*. 20: 297-330.

Polis, G.A. & Strong, D.R. (1996). Food web complexity and community dynamics. *The American Naturalist*. 147 (5): 813-846.

Powell, D.A. & Bellows, T.S. Jr. (1992). Development and reproduction of two populations of *Eretmocerus* species (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology*. 21: 651-658.

Rosenheim, J.A. & Harmon J.P. (2010). The influence of intraguild predation on the suppression of the shared prey population an empirical reassessment.p:1-21.En: *Trophic and guild interaction in biological control*. Ed: J. Brodeur y G. Bouvin. Springer. The Netherlands. 241p.

Rosenheim, J.A., Kaya, H.K., Ehler, L.E., Marois, J.J., Jaffee, B.A. (1995) Intraguild predation among biological control agents: theory and evidence. *Biological Control* 5: 303–335. doi: 10.1006/bcon.1995.1038

Seelman, L., Auer, A., Hoffmann, D., Schausberger, P. (2007).Leaf pubescence mediates intraguild predation between predatory mites. *Oikos*. 116:807-817.

Sheppard, S. & Harwood, J.D. (2005). Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food webs. *Functional Ecology*.19:751-762.

SIAP- SAGARPA. 2013. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado 5 de junio de 2013.

Snyder, W.E. & Ives, A.R. (2008). Behavior Influences Whether Intra-Guild Predation Disrupts Herbivore Suppression by Parasitoids. En: Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: From Theoretical Approaches to Field Applications. Cap. 4.

Soler, R. & van Lenteren, J.C. (2004). Reproduction and development of *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Proc Neth Entomol Soc .15: 111-117 12.

Sorhabi, F., Enkegrad, A., Shishebor, P., Saber, M., Mossaddegh, M. (2013). Intraguild predation by the generalist predator *Orius majusculus* on the parasitoid *Encarsia formosa*. Biocontrol. 58: 65-72.

Soto, A.G., Apablaza, J.H., Norero, A.S., Estay, P.P. (1999). Requerimientos térmicos de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) en tomate (*Lycopersicon sculentum*). Ciencia e Investigación Agraria. 26: 37-42.

Sura, S.A. & Mahon, H.K. (2011). Effects of competition and predation on the feeding rate of the freshwater snail, *Helisomma trivolvis*. American Midland Naturalist Journal 166: 358-368.

Sutterlin, S. & van Lenteren J.C. (1997). Influence of hairiness of *Gerbera jamesonii* leaves on the searching efficiency of the parasitoid *Encarsia formosa*. Biological Control. 9: 157-165.

Tillman, P.G. & Mullinix, G. (2003). Effect of Prey Species on Plant Feeding Behavior by the Big-Eyed Bug, *Geocoris punctipes* (Say) (Heteroptera: Geocoridae), on Cotton. Environmental Entomology. 32(6): 1399-1403.

van Baaren, J., Boivin, G. & Nénon, J.P. (1994). Intra- and interspecific host discrimination in two closely related egg parasitoids. Oecologia. 100: 325-330.

Vance-Chalcraft, H. D., Rosenheim *et al.*, J. A., Vonesh, J. R., Osenberg, C. W., Sih, A. (2007). The influence of intraguild predation on prey suppression and prey release: a meta-analysis. Ecology. 88 (11): 2689-2696.

Velasco-Hernandez, M.C., R. Ramirez-Romero, L. Cicero, C. Michel-Rios, N. Desneux (2013). Intraguild Predation on the Whitefly Parasitoid *Eretmocerus eremicus* by the generalist predator *Geocoris punctipes*: A Behavioral Approach. Plos one.8. (11): 1-7.

Vet L.E.M. & Godfray C.J. (2008). Multitrophic interactions and parasitoid behavioral ecology. In: Wajnberg E., Bernstein C. and Van Alphen J. Behavioral Ecology of Insect

Parasitoids. Blackwell, Oxford UK : 231-252.

Zar, J.H. (1999). Biostatistical analysis. New Jersey USA: Prentice Hall International.
663 p.

10. Anexos

Anexo 1: Manuscrito aceptado y publicado en la revista: Pest Management Science (Factor de Impacto: 2.694), que presenta los resultados obtenidos en la primera parte de la tesis (sección 6.1.1).

Referencia: Bao-Fundora, L., Ramirez-Romero, R., Sánchez-Hernández, C.V., Sánchez-Martínez, J., Desneux, N. (2015). Intraguild predation of *Geocoris punctipes* on *Eretmocerus eremicus* and its influence on the control of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. Pest Management Science. Doi: 10.1002/ps. 4163.

Anexo 2: Experimento preliminar para determinar el número mínimo de presas que se pueden detectar por análisis de PCR en el tracto digestivo del depredador *G. punctipes*.

Objetivo: Este experimento se desarrolló para determinar la cantidad mínima de presas (avispa y moscas blancas) que se podía detectar en el tracto digestivo del depredador (chinche) al analizar las muestras de ADN extraídas del mismo, mediante PCR.

Materiales y Métodos:

Cada *Geocoris punctipes* (8-20 días de edad) fue ubicado en cajas Petri de 6cm de diámetro con papel de filtro, mantenidos sin dieta artificial, sólo con agua, durante tres días a $T=24\pm 3^{\circ}\text{C}$, HR: $50\pm 10\%$ y fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

Después de tres días, se ubicaron de forma individual en cajas Petri de 9cm de diámetro con papeles de filtro que contenían discos foliares con diferente cantidad de presas, lo cual constituyó los tratamientos. Estas fueron 1 presa, 3 presas, 5 presas y 10 presas. Las presas fueron las ninfas de mosca blanca de 2 y 3 estadio y las ninfas de mosca blanca parasitadas que contenían ADN de la avispa. Cada individuo, se dejó forrajear por tres horas hasta completar el consumo de las ninfas expuestas. Al terminar este periodo de alimentación, se sacrificaron en alcohol al 70% y se guardaron para los análisis moleculares, los cuales se realizaron con los mismos procedimientos descritos en los apartados 5.5.1 y 5.5.2. Se replicó el bioensayo 5 veces.

Resultados:

Se muestran los geles electroforéticos obtenidos del análisis molecular, donde se evidencia (para cada presa) que el número mínimo detectable es 3 en la mayoría de los individuos evaluados.

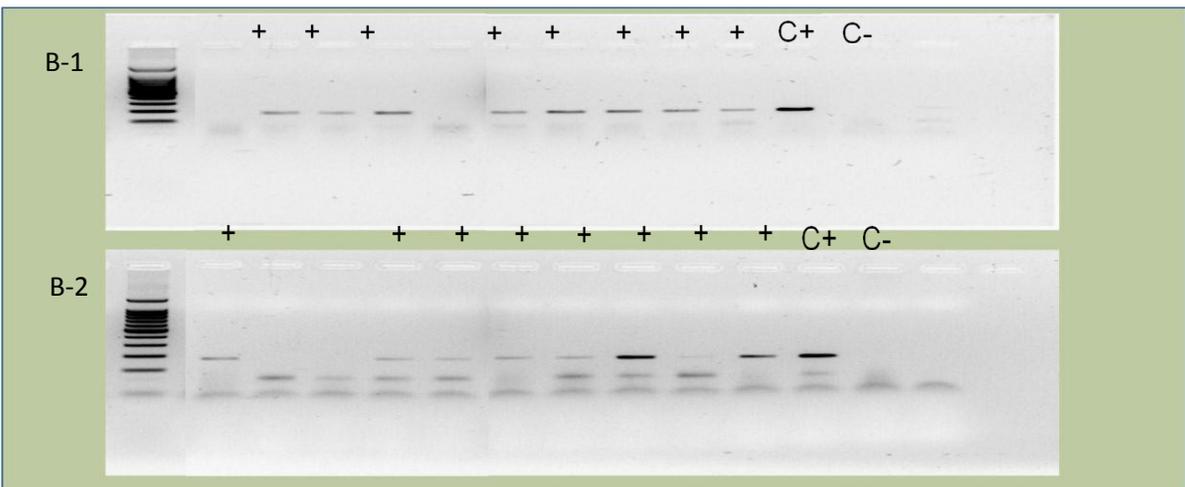
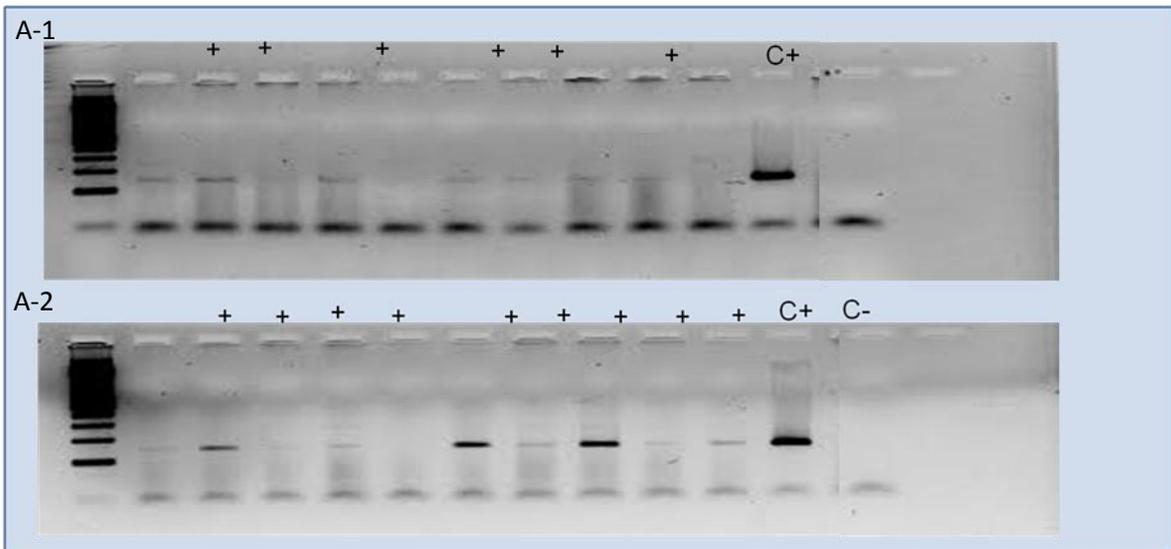


Figura 12: Productos de amplificación usando los cebadores para detectar el mínimo número de presas (*E. eremicus* (A) or *T. vaporariorum* (B)) que puede ser detectado en el tracto digestivo de *G. punctipes*. Gel A -1 y B-1: carril 2-6: 1 presa ingerida, carril 7-11: 3 presas ingeridas. Gel A-2 y B-2: carril 2-6: 5 presas ingeridas, carril 7-11: 10 presas ingeridas. carril 1, 100bp DNA ladder; C⁺, control positivo; C⁻, no DNA. + Significa una detección de ADN positiva.

Anexo 3: Experimento preliminar para determinar el tiempo en que permanece el ADN de la presa en el tracto digestivo del depredador.

Objetivo: Este experimento se desarrolló para determinar el tiempo mínimo que permanecía sin degradarse el ADN de (avispa y moscas blancas) en el tracto digestivo del depredador (chinche), al analizar las muestras de ADN del mismo mediante PCR.

Materiales y Métodos:

Cada *Geocoris punctipes* (8-20 días de edad) fue previamente ubicado en cajas Petri de 6cm de diámetro con papel de filtro, mantenidos sin dieta artificial, sólo con agua, durante tres días a $T= 24\pm 3^{\circ}\text{C}$, HR: $50\pm 10\%$ y fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

Después de tres días, se ubicaron de forma individual en cajas Petri de 9cm de diámetro con papeles de filtro que contenían tres discos foliares de jitomate con una ninfa de mosca blanca de segundo o tercer estadio. Cada individuos, se dejó forrajear por dos horas hasta completar el consumo de las ninfas expuestas. Al terminar este periodo de alimentación, se colocaron de manera individual en cajas de Petri, separadas de las ninfas, pero con una dieta *ad libitum*, en este caso de pulgones *Myzus persicae* y además se añadió un algodón con agua. Las horas que permanecieron vivos después del consumo, sin alimentarse de la presa primaria, fueron los tratamientos: 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48h.

Luego se sacrificaron en alcohol al 70 % y se guardaron para los análisis moleculares con los mismos procedimientos descritos en los apartados 5.5.1 y 5.5.2. Se replicó el bioensayo 10 veces.

Se realizó un bioensayo con las mismas condiciones experimentales, pero utilizando las ninfas de mosca blanca parasitadas por la avispa *Eretmocerus eremicus* como presa. Los resultados se muestran como el número de individuos que resultó positivo en la detección de ADN década presa, luego de los diferentes tiempos de consumo.

Resultados:

Tabla 3. Número de individuos del total de individuos analizados que resultaron positivos en la detección de ADN después de cada tiempo de consumo, en el caso de las ninfas de mosca blanca como presas (NMB) o las ninfas de mosca blanca parasitadas (NMB-P)

Presa	0h	3h	6h	12h	24h	48h
NMB	8(10)	7 (10)	9(10)	5(10)	4(10)	2(10)
NMB-P	10 (10)	10 (10)	8(10)	7(10)	6(10)	6(10)

Intraguild predation of *Geocoris punctipes* on *Eretmocerus eremicus* and its influence on the control of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*

Lourdes Bao-Fundora¹, Ricardo Ramirez-Romero¹, Carla V. Sánchez-Hernández¹, José Sánchez-Martínez¹, Nicolas Desneux².

¹ *Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México.*

² *French National Institute for Agricultural Research (INRA), Univ. Nice Sophia Antipolis, CNRS, UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06903 Sophia-Antipolis, France*

Please correspond with:

Ricardo Ramirez-Romero
Departamento de Producción
Agrícola
CUCBA, Universidad de
Guadalajara
Apartado Postal 139
45110 Zapopan, Jalisco, Mexico
rramirez@cucba.udg.mx

Keywords: Lygaeidae, Aphelinidae, Aleyrodidae, Intra-guild predation

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/ps.4163

ABSTRACT

BACKGROUND: *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) and *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) are whitefly natural enemies. Previously, under laboratory conditions, we showed that *G. punctipes* engages in intraguild predation (IGP), the attack of one natural enemy by another, on *E. eremicus*. However, it is unknown whether this IGP interaction takes place under more complex scenarios, such as semi-field conditions. Even more importantly, the effect of this interaction on the density of the prey population requires investigation. Therefore, the present study aimed: (i) to establish whether this IGP takes place under semi-field conditions, and (ii) to determine whether the predation rate of *G. punctipes* on the whitefly decreases when IGP takes place.

RESULTS: Molecular analysis showed that, under semi-field conditions, *G. punctipes* performed IGP on *E. eremicus*. However, although IGP did take place, the predation rate by *G. punctipes* on the whitefly was nevertheless higher when both natural enemies were present together than when the predator was present alone.

CONCLUSION: While IGP of *G. punctipes* on *E. eremicus* does occur under semi-field conditions, it does not adversely affect whitefly control. The concomitant use of these two natural enemies seems a valid option for inundative biological control programs of *T. vaporariorum* in tomato.

1. INTRODUCTION

The whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) is a sucking pest, native to Central and South America.^{1,2} This whitefly is a cosmopolitan species considered an important pest as it can lead to substantial economic losses in different crops, such as tomato, cotton, and beans.²⁻⁴ Its hemimetabolous life cycle includes cylindrical eggs, four nymphal instars, and adult development.² The whole life cycle can last up to 30-80 days (depending upon temperature), with multiple generations per year.² The rates of oviposition and infestation are influenced by factors such as environmental conditions, host plant, inter- and intraspecific competition, and presence of natural enemies.^{2,5,6}

One of the whitefly natural enemies used successfully as a biocontrol agent is the parasitoid *Eretmocerus eremicus* Rose and Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae).⁷⁻⁹ This solitary endoparasitoid prefers to oviposit on 2nd and 3rd instar whitefly nymphs.¹⁰⁻¹² Its pre-imaginal developmental period can last from 16 to 32 days and females can live up to 11 days and oviposit on average about 5 eggs per day on *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring nymphs as hosts.¹³

In turn, the predator *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) is another common natural enemy of this pest in the Americas.¹⁴⁻¹⁷ This polyphagous predator has a nymphal development of 23-36 days and a subsequent adult stage than can last up to 108 days.¹⁸ Adults of this species can mate three days

after emergence and can start oviposition after five days following emergence.^{18,19} In a companion study, we found that, under laboratory conditions, *G. punctipes* prey upon nymphs and adults of the wasp *E. eremicus*.²⁰ This kind of trophic interaction, in which one natural enemy of a target pest preys on another natural enemy of the same pest, is known as intraguild predation (IGP) and can take place with various natural enemies.^{21,22} Until now, it was unknown whether IGP between these two species takes place under more complex scenarios, such as field or semi-field conditions. Also unknown was the effect of IGP occurrence on *T. vaporariorum* control.

Complementary studies under more natural conditions are important because factors related to the complexity of agro-ecosystems, such as environmental variations, plant size or structure, and leaf properties (e.g. epicuticular waxes, trichomes, or domatia) can influence interactions among insects.²³⁻²⁶ More specifically, these properties of environmental complexity can affect IGP.^{27,28} For example, the IGP rate was reduced when plants were used in bioassays, compared with bioassays using arenas without plants.²⁸ Moreover, Seelman *et al.*²⁷ found that the rate and direction of IGP was influenced by the pubescence of the leaves. Clearly, it is important to determine whether a more complex scenario modifies (or not) the IGP observed under laboratory conditions and, more importantly, the potential effect of this interaction on pest control.

Indeed, it has been shown that IGP can influence pest control by reducing,²⁹⁻³¹ increasing³² or maintaining the pest control unchanged.³³ For example, it has

been proposed that the preference of IG-predators can play a role in the net effect of the predation rate of the IG-predator on pests.³² The IG-predator *G. punctipes* is known to prefer moving prey to immobile prey.³⁴ Therefore, if this IG-predator would be confronted with mobile prey (adult wasps) *versus* immobile prey (whitefly nymphs), *G. punctipes* might preferably prey upon adult wasps (i.e. exhibiting IGP). If so, a reduction in the predation rate of *G. punctipes* on the whitefly could be expected (relative to conditions in which *G. punctipes* is confronted with whitefly nymphs only). Therefore, as a second objective of this study, we aimed to determine whether the whitefly predation rate by *G. punctipes* decreases when IGP is taking place.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plants

Tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Saladette') were bought at La Casa del Hortelano (Guadalajara, Jalisco, México). Seeds were planted on plastic germinating trays under environmental conditions of $24 \pm 3^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ relative humidity, and a 12:12 (light: darkness) photoperiod. When plants reached the third leaf of development they were transferred to individual plastic pots (16 cm high, 18 cm diameter). Each pot contained a mixture consisting of vermicompost (Lombrifert®, CUCBA, Universidad de Guadalajara), pumice, and coir (Germinza®, Germinaza SA de CV, Mexico). Plants were grown under natural conditions in experimental cages (see below) and used in experiments when they reached the fourth leaf of development. Plants were protected from exposure to herbivores using plastic cylinders containing anti-aphid mesh-

covered windows (see below). Any type of pesticide application was strictly avoided.

2.2 Insects

All insects were reared in acclimatized chambers at a temperature of $24\pm 3^{\circ}\text{C}$, a relative humidity of $50 \pm 10\%$ and a 14h:10h (light: darkness) photoperiod.

2.2.1 *Whitefly* *Trialeurodes vaporariorum*

Whiteflies used in the experiments came from our colonies founded by individuals provided by Dr. Carla Sanchez-Hernández (Universidad de Guadalajara, Mexico) and taxonomically verified by the Aleyrodidae specialist Dr. Vicente Carapia (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico). These were virus-free whiteflies. These colonies were reared on tomato plants placed in acrylic cages ($38.5 \times 30.0 \times 45.0$ cm) with sides covered with anti-aphid mesh.

2.2.2 *Parasitoid* *Eretmocerus eremicus*

Parasitoids were provided by Koppert México SA de CV (Querétaro, México) as parasitized nymphs in cardboard shipping containers. The nymphs were placed inside acrylic cages ($38.5 \times 30.0 \times 45.0$ cm) and inspected daily to determine adult emergence date. Upon emergence, adults were fed a honey solution (7:3 ml, honey: water), which was offered on a paper towel (5 cm^2), and tap water; food was replaced every day.²² Parasitoids were used when they were 2-4 days

old because it is known that they can mate and oviposit when they are 1 day old³⁵ and can live up to 11 days.¹³

2.2.3 *Predator Geocoris punctipes*

Predators were provided by Organismos Benéficos para la Agricultura (Jalisco, México) as nymphs. Upon their arrival in our laboratory, nymphs were placed inside polystyrene cages (40 × 63 × 63 cm) and fed ad libitum with ≈ 5 g of artificial diet²⁰, pollen (5 g, Apiarios Rancano, D.F., México), and sorghum seeds (10 g, var. UDG-110, UdG, Mexico). Artificial diet was replaced everyday and pollen and sorghum seeds once a week.²⁰ Female predators were used in experiments when they were 8-20 days old because after 5 days females can produce fertile eggs and they can live up to 108 days.¹⁸

2.3 Experimental setup

Bioassays were carried out under field conditions within wood field cages (3×3×3 m) with sides containing anti-aphid mesh, placed in campus experimental grounds (20°44'47'' N and 103°30'43'' W) (CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, Mexico). During the experimental period, a mean temperature (± SD) of 25.31°C (± 10.8°C) and a mean relative humidity (±SD) of 55.48% (± 28.16%) were recorded (Datalogger RHT10, Extech® Instruments, MA, USA).

Within the field cages we set up microcosms containing the tested treatments. Each microcosm consisted of a tomato plant enclosed in a plastic cylinder (28

cm high and 18 cm diameter) with 6 holes (9.5 cm diameter, each) covered with anti-aphid mesh for ventilation. Before use in experiments, each of these microcosms was infested with 150 adult whiteflies, which were allowed to oviposit for 48 h. After this period, whitefly adults were removed from the microcosms and laid eggs were allowed to develop for 14 days. After this period of time we recorded the number of nymphs at the 2nd and 3rd stage using a 40× magnifying glass (Victorinox®, Mexico). Any 1st stage nymphs that were present at this timepoint were removed from the plants. Thus, the experimental set up contained 200-230 nymphs at the 2nd or 3rd nymphal stage.²⁰

We established five treatments: 1) control (only whitefly nymphs), 2) whitefly nymphs and predators, 3) whitefly nymphs, predators, and parasitoids, introduced concomitantly, 4) whitefly nymphs, parasitoids, and predators, introduced consecutively, and 5) whitefly nymphs and parasitoids. Treatment 1 (hereafter referred to as 'control') consisted of microcosms containing whitefly nymphs and submitted to the same environmental and experimental conditions as the other treatments, but without natural enemy exposure. This control allowed us to establish a benchmark predation rate for *G. punctipes*. In treatment 2 (hereafter referred to as 'Tv+Gp'), a microcosm containing whitefly nymphs was set up and 6 female predators were released within the microcosm. Taking into account preliminary observations, we used six females in each microcosm to determine nymph consumption rate per female per day, with an initial number of available nymphs of 200-230. After release, the female predators were allowed to forage within the microcosm for 48 hours.³⁶ After

this period of time, predators were removed from microcosms, preserved in 70% ethanol (v:v), and stored at 4°C for subsequent analysis for whitefly DNA detection.³⁷ In treatment 3 (hereafter referred to as 'Tv+Gp+Ee'), we simultaneously released 6 female predators and 19 parasitoid pairs (19 females + 19 males) into a microcosm containing whitefly nymphs. This wasp number was chosen in accordance with the daily rate of oviposition of *E. eremicus* and host density.¹³ Both natural enemies were allowed to forage during 48 hours concomitantly. After this period of time, predators were captured and preserved in 70% ethanol (v:v) at 4°C for subsequent analysis for whitefly and parasitoid DNA detection³⁷. At the same time, wasps were also removed from microcosms and preserved in ethanol. In treatment 4 (hereafter referred to as 'Tv+Ee⇒Gp'), we released 19 parasitoids pairs (19 females + 19 males) into a microcosm containing whitefly nymphs. After introducing the wasps, we let them forage for 48 hours, a similar time to that for predators in the previous treatment. After this period of time, the adult wasps were removed from the microcosm, and after 18-20 days (when the developing wasps had reached the last larval stage³⁸), 6 female predators were introduced into the microcosm and allowed to forage for 48 hours. The female predators were then recovered and preserved in 70% ethanol (v:v) at 4°C until further analysis (prey DNA detection; see below). Treatment 5 (hereafter referred to as 'Tv+Ee') consisted of a microcosm with whitefly nymphs and 19 pairs of parasitoids. These parasitoids were allowed to forage for 48 hours, and were then removed from the microcosm. After removing the natural enemies, the microcosms were promptly put back into field cages. For treatments 2, 3 and 4 we recorded the

number of whitefly nymphs preyed upon by *G. punctipes*. For these treatments, the counting of nymphs preyed upon was performed the same day that predators were extracted. For this count, all leaves of each plant were scrutinized under a stereomicroscope (DV4 Carl Zeiss). For all treatments, the number of emerged adult whiteflies was recorded 30 days following the whitefly oviposition period, in consideration of whitefly development time.^{2,39} The number of parasitized nymphs was recorded 18 days following the parasitism period. Finally, the number of emerged wasps was recorded 25 days following the parasitism period. These time-points for counting of parasitized nymphs and adult wasps were determined in accordance with earlier observations and previous literature on the development of *E. eremicus*.^{20,38,40} We followed a randomized block design with time as the blocking factor. Each treatment was replicated 11 times.

2.4 IGP assessment by molecular analysis

To determine whether IGP occurs under natural conditions, we looked for traces of prey DNA in predator homogenates from treatments 2 (Tv+Gp), 3 (Tv+Gp+Ee), and 4 (Tv+Ee⇒Gp). In these analyses, DNA (including possible whitefly and parasitoid DNA) was extracted from predators using whole predator bodies following the protocol described by Cenis *et al.*⁴¹ Briefly, individual insects were crushed in 2.0 ml microcentrifuge tubes and homogenized with a Kontes pellet pestle in 100 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). One hundred microliters of 3M sodium acetate (pH 5.2) was added and tubes were placed in

a -20°C freezer for 10 min. After centrifugation, the supernatant was transferred to another tube and the DNA was precipitated with isopropanol. The pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in 35 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis and quantified by a Q5000 Quawell spectrophotometer (Quawell Technology, CA, USA). DNA was stored at -20°C until required. For PCR analysis, the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene was targeted for *T. vaporariorum* detection using previously reported Tv1F/Tv1R primers.⁴² *Eretmocerus eremicus*-specific primers (5'TTGGTGTCTCAATTTTATATC3'/5'ATACTCAAATCCTTCCGC-3') were designed from the internal transcribed spacer (ITS-1) region (Genbank AB662973) to generate a ~143 bp amplicon. Primers were tested for cross reactivity and performance in PCR. PCR amplifications were performed in a Swift maxi thermo cycler (ESCO, PA, USA). Reactions were prepared in a total reaction volume of 25 µl containing 500ng of DNA, 1X PCR buffer (50 mM KCL; 20 mM Tris-HCl, pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 2 U of Invitrogen Taq DNA polymerase (Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). The cycling conditions were set as follows: initial denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 3 min; annealing at 63°C for 30 s; extension at 72 °C for 40 s and a final extension step at 72 °C for 10 min. Prey DNA (*T. vaporariorum* or *E. eremicus*) and *G. punctipies* DNA or autoclaved distilled water were included as positive and negative controls, respectively. PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide and

visualized under UV light. A predator was considered negative for prey DNA if prey DNA was not detected after two separate analyses. The results are reported as the proportion of predators in which prey DNA was detected (i.e. the number of predators with prey DNA / total number of analyzed predators).

2.5 Whitefly predation rate by *G. punctipes* also engaging in IGP

To determine whether the predation rate of *G. punctipes* on whiteflies decreases under IGP scenarios, we focused on the percentage of whitefly nymphs preyed upon by *G. punctipes* in treatments Tv+Gp+Ee (simultaneous release) and Tv+Ee⇒Gp (sequential release) and compared these with the percentage of whitefly nymphs preyed upon in treatment Tv+Gp (individual release).

2.6 Data analysis

To compare the mean percentage of nymphs preyed upon by *G. punctipes* (i.e. [number of whitefly nymphs preyed upon by the predator / initial number of whitefly nymphs] × 100) among treatments, we used a one-way ANOVA, since data met normality and homoscedasticity requirements. For whitefly density, we compared the mean percentage of emerged whitefly adults (i.e. [number of emerged whitefly adults / initial number of whitefly nymphs] × 100) among all treatments using a generalized linear model (GLM) with a gamma error and a log link function⁴³. The mean percentage of parasitized nymphs (i.e. [number of parasitized whitefly nymphs / initial number of whitefly nymphs] × 100) and the mean percentage of emerged wasps (i.e. [number of emerged wasps / initial number of whitefly nymphs] × 100) were also subjected to a one-way ANOVA,

but after $\log(x + 1)$ transformations⁴⁴ to fit normality and homoscedasticity requirements. For all models, the block was included as an explanatory variable in each model. Post-hoc tests were performed with contrasts derived from the linear model.⁴³ All analyses were performed using R, version 3.1.1.⁴⁵

3. RESULTS

3.1 IGP of *G. punctipes* on *E. eremicus*, molecular assessment

Our results show that under semi-field conditions, the predator *G. punctipes* engages in IGP on the wasp *E. eremicus* (Table 1). High percentages of predators containing wasp DNA were found both in the concomitant release treatment (Tv+Gp+Ee: 89.7%) and in the sequential release treatment (Tv+Ee⇒Gp: 90.7%).

3.2 Whitefly predation rate by *G. punctipes* also engaging in IGP

When the mean percentage of nymphs preyed upon by *G. punctipes* was compared among treatments, we found significant differences ($F_{2,28}=97.273$; $P<0.001$) (Figure 1A). Unexpectedly, the highest number of preyed upon nymphs was recorded in the treatment where both natural enemies were concomitantly present (Tv+Gp+Ee), followed in descending order by the predator-only treatment (Tv+Gp) and the sequential introduction of both natural enemies (Tv+Ee⇒Gp) (Figure 1A).

3.3 Emerged adult whiteflies, parasitized nymphs and emerged wasps

As for the mean percentage of emerged whiteflies, we found significant differences when treatments were compared ($F_{4,48}=18.574$; $P<0.001$) (Figure 1B). The treatments with the highest rate of emerged flies were the control, Tv+Gp

and Tv+Ee. Those with the lowest rate of emerged flies were Tv+Gp+Ee and Tv+Ee⇒Gp (Figure 1B).

The mean percentage of parasitized nymphs was significantly different among treatments ($F_{2,28}=39.585$; $P<0.001$) (Figure 2A). The highest number of parasitized nymphs was recorded in the treatments Tv+Ee and Tv+Ee⇒Gp, followed by the treatment Tv+Gp+Ee (Figure 2A). A similar trend was found when the mean percentage of emerged wasps was compared ($F_{2,28}=27.328$; $P<0.001$). The treatment with the highest percentage of emerged wasps was Tv+Ee, followed by Tv+Ee⇒Gp and Tv+Gp+Ee (Figure 2B).

4. DISCUSSION

Our results show that the predator *G. punctipes* engages in IGP on the wasp *E. eremicus* under natural conditions (Table 1). However, although IGP occurred, the predation rate of *G. punctipes* on whitefly nymphs was higher when both natural enemies were concomitantly released (i.e., under IGP conditions) than when *G. punctipes* was released alone (Figure 1A).

4.1 Intraguild predation assessment

Previously, under laboratory conditions, we found that *G. punctipes* exhibits IGP on *E. eremicus* nymphs and adults.²⁰ However, it was unknown whether IGP occurred under more complex conditions. This is important because effects observed under laboratory conditions will not necessarily take place in field or semi-field conditions.⁴⁶⁻⁴⁸ Some of the factors that could be related to these differential results include experimental conditions or environment complexity

(e.g. climate, plant structure, leaf properties, light or season).^{23-26,46,47} For IGP specifically, it is known that the use of plants, as opposed to bare artificial arenas, and the pubescence of leaves can modify the rate at which IGP occurs.^{27,28} As a result, the complexity of analyzed systems can influence the outcome of interactions and particularly that of IGP. Therefore, we were first interested in determining whether the predator *G. punctipes* exhibited IGP on the parasitoid *E. eremicus* under semi-field conditions. Our results showed that the predator does in fact engage in IGP on the parasitoid. High percentages of analyzed predators contained wasp DNA when the two natural enemies were released into a microcosm together (89.7%) or sequentially (90.7%). In the treatment with concomitant release (Tv+Gp+Ee), the predators remained with the adult wasps for 48h. At this point, the wasp DNA detected in predators was more likely obtained from adult wasps than from immature wasps. This is because the parasitoid egg is oviposited externally under the whitefly nymph and the invasion of the host nymph can take two or more days after parasitoid larvae hatching.^{49,50} In contrast, in the treatment with sequential release of natural enemies (Tv+Ee⇒Gp), the predators were confronted with parasitized nymphs only. In this case, the wasp DNA detected in the predators was from these immature parasitoids developing in the host. These results are in line with previous observations under laboratory conditions indicating that *G. punctipes* can prey upon adult and immature stages of *E. eremicus*.²⁰ This could be relevant in terms of planned biological control programs. For example, if a joint release is intended (concomitant or sequential), our results indicate that parasitoids (immature or adults) would be preyed upon and, as a result, a low

rate of parasitism (Figure 2A) and wasp emergence (Figure 2B) would arise. Therefore, the joint release of both natural enemies (concurrent or sequential) seems not to favor (at least on the side of the wasp) an inoculative biological control program; where the reproduction of natural enemies is sought.⁵¹ If what is sought is the establishment of *E. eremicus*, our results suggest that an individual release (without predators) will be more favorable (Figure 2B). In contrast, if what is planned is inundative releases (where the main goal is the control of the pest, without the need for reproduction of natural enemies), the concomitant or sequential release of *G. punctipes* and *E. eremicus* could be much more successful than individual releases (Figure 1B). These results point out the importance of analyzing different combinations of natural enemies before combined releases are implemented, to optimize the effectiveness of a biological control program.³¹

4.2 Whitefly predation rate by *G. punctipes* also engaging in IGP

The other important point we analyzed in the current study was whether IGP occurrence, reduced the predation rate of *G. punctipes* on the pest and, consequently, the efficacy of biological pest control. Previous literature reported that, in fact, occurrence of IGP could result in a reduction of pest control.²⁹⁻³¹ For example, IGP of *Pardosa littoralis* (Araneae: Lycosidae) on *Tyttus vagus* (Hemiptera: Miridae) resulted in an increase in their shared prey, the *Pronkelisia* planthoppers.³⁰ However, in other cases it has been documented that despite the presence of IGP, control of pests increases³² or remains unchanged.³³ These heterogeneous outcomes indicate the variability of the influence of interactions

such as IGP on pest control. In the specific case of our short-term biological model, we expected that IGP of *G. punctipes* on adult *E. eremicus* would reduce nymph whitefly predation and, consequently, would reduce pest control efficacy. This hypothesis was postulated taking into account the fact that *G. punctipes* exhibits a preference for mobile prey over non-mobile targets.³⁴ That is to say, we expected that when *G. punctipes* was confronted with both options (adult wasps *vs.* whitefly nymphs), it would preferably attack adult wasps, reducing its rate of predation on whitefly nymphs. Consequently, the rates of consumed whitefly nymphs would be lower in the treatment with concomitant release (Tv+Gp+Ee) relative to that with the predator alone (Tv+Gp). Nevertheless, our results showed that, contrary to our expectations, the rate of consumed whitefly nymphs was significantly higher in the Tv+Gp+Ee treatment relative to Tv+Gp (Figure 1A). This indicates that, in spite of the consumption of the parasitoids (i.e. IGP) (Table 1), for some reason, the predator increases the rate of consumed nymphs relative to conditions in which it is the lone natural enemy. That reason is likely related to the perception of adult wasps and a proximal response of the predator to the detection of that prey. The wasp presence can be revealed through semiochemical signals or movements. Semiochemical signals could be those traces left by wasps while walking, parasitizing, or feeding hosts,⁵²⁻⁵⁴ and these signals can be detected by predators.^{19,55-58} Movement could be the other signal revealing the presence of wasps because the predator *G. punctipes* has been reported to be positively attracted to mobile prey.³⁴ The perception of wasps could then trigger an increase in predation rate by *G. punctipes*, because some predators (including *G.*

punctipes) increase kills when prey density increases^{34,36,59,60} or as a response to competition represented by wasps.^{61,62} Further experiments are required to better assess the reason for this predator's response and the potential outcomes on the prey- predator- parasitoid long-term population dynamics.

One final point, from the perspective of applied entomology, is related with the rate of emergence of adult whiteflies. We found that the lowest rates of whitefly emergence were found in treatments with joint release of natural enemies (Figure 1B). This indicates that pest control with the joint release of natural enemies (despite IGP occurrence) is more effective than that with the release of a single natural enemy. This suggests that both natural enemies are inducing pest kills additively. Indeed, when we analyzed concomitant release (Tv+Gp+Ee), we observed that the predator exhibited a higher rate of nymph consumption (Figure 1A). Parasitoids, meanwhile, parasitized fewer nymphs (Figure 2A) in that treatment, but, regardless, joint action (Tv+Gp+Ee) resulted in the lowest rate of whitefly emergence (Figure 1B). A similar rate of pest emergence was obtained in the Tv+Ee⇒Gp treatment (Figure 1B), in which the predator consumed fewer nymphs (Figure 1A) but the wasps parasitized more nymphs (Figure 2A). These results are in line with other studies that have reported that natural enemies that participate in IGP act additively in pest control.⁶³

5. CONCLUSION

Our results showed that *G. punctipes* engages in IGP on immature and adult stages of *E. eremicus* under semi-field conditions. However, contrary to our expectations that in the presence of IGP, pest control might be reduced, the whitefly consumption rate was instead increased with a simultaneous release of both natural enemies. Consequently, whitefly infestation was lowest when both natural enemies were released. These results indicate that the joint release of these natural enemies should be effective to control whitefly, in a framework of inundative release, despite the presence of IGP.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonio Biondi (University of California, Berkeley, USA) for useful comments in an early version of the manuscript and Dr. Claudia S Copeland for English editing services. Financial support was provided by the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT, project number 157259 granted to RR-R). An MSc scholarship was provided by CONACyT to LB-F (No. 213503788). This study comprised part of the requirements for the Master's degree of LB-F, supervised by RR-R. We also acknowledge Koppert, México and Organismos Benéficos para la Agricultura, Autlán, México, for supplying insects.

REFERENCES

- 1 Gill RJ, The morphology of whiteflies. *Sec Ref* **78**:13-46 (1990)
- 2 Byrne DN and Bellows TS, Whitefly biology. *Ann Rev Entomol* **36**: 431-57 (1991).
- 3 Ruiz Nájera RE, Ruiz Nájera JA, Guzmán S and Pérez Luna EJ, Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, México. *Rev Int Cont Amb* **27**: 129-137(2011).
- 4 Díaz MA, Cantor F and Rodríguez D, Análisis estadístico de la producción de un biocontrolador de la mosca blanca en plantas de frijol bajo invernadero. *Comm Estad* **4**: 95- 106 (2012).
- 5 Azab AK, Megahed MM and El Mirsawi DH, On the biology of *Bemisia tabaci* (Genn.). *Bull Soc Entomol Egypte* **55**: 305-15 (1971).
- 6 Gameel OI, Some aspects of the mating and oviposition behaviour of the cotton whiteny *Bemisia tabaci* (Genn.). *Rev Zool Afr* **88**: 784-88 (1974).
- 7 Badii MH and Abreu JL, Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Int J Good Cons* **1**: 82-89 (2006).
- 8 Gerling D, Alomar O and Arno J, Biological control of *Bemisia* using predators and parasitoids. *Crop Prot* **20**: 779-799 (2001).
- 9 van Lenteren JC, Commercial availability of biological control agents, in *Quality Control and Production of Biological Control Agents*, ed. by van Lenteren JC, CABI Pub. Cambridge, pp. 167-179 (2003).
- 10 Gerling D, Natural enemies of whiteflies: predators and parasitoids. in *Whiteflies, their bionomics, pest status and management*, ed. by Gerling D, Intercept, Andover, UK, pp. 147-186 (1990).
- 11 De Barro PJ, Hart PJ and Morton R, The biology of two *Eretmocerus* spp. (Haldeman) and three *Encarsia* spp. (Hymenoptera: Aphelinidae) Forster and their potential as biological control agents of *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *Entomol Exp Appl* **94**: 93-102 (2000).
- 12 Headrick DH, Bellows TS Jr. and Perring TM, Behaviors of female *Eretmocerus* sp. nr. *californicus* (Hym.Aphelinidae) attacking *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton, *Gossypium hirsutum*,

- (Malvaceae) and melon, *Cucumis melo* (Cucurbitaceae). *Biol Control* **6**: 64–75 (1996).
- 13 Headrick DH, Bellows TS and Perring TM, Development and reproduction of a population of *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ Entomol* **28**: 300-306 (1999).
- 14 López-Ávila A, Cardona MC, García GJ, Rendón F and Hernández P, Reconocimiento e identificación de enemigos naturales de las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Rev Colomb Entomol* **27**: 137-141 (2001).
- 15 Hagler JR, Jackson CG, Isaacs R and Machtley SA, Foraging behavior and prey interactions by a guild of predators on various lifestages of *Bemisia tabaci*. *J Insect Sci* **4**: 1-13 (2004).
- 16 Torres JB and Ruberson JR, Interactions of Bt-cotton and the omnivorous big-eyed bug *Geocoris punctipes* (Say), a key predator in cotton. *Biol Control* **39**: 47-57 (2006)
- 17 Calixto AM, Bueno VHP, Montes FC and van Lenteren JC, Development and thermal requirements of the Nearctic predator *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Geocoridae) reared at constant and alternating temperatures and fed on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. *Eur J Entomol* **111**: 521–528 (2014).
- 18 Champlain RA and Sholdt LL, Life history of *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) in the Laboratory. *Ann Entomol Soc Am* **60**: 881–883 (1967).
- 19 Marques FDM, Elfresh MC and Millar JG, Female produced sex pheromone of the predatory bug *Geocoris punctipes*. *J Chem Ecol* **26**: 2843–2855 (2000).
- 20 Velasco-Hernandez MC, Ramirez-Romero R, Cicero L, Michel-Rios C and Desneux N, Intraguild predation on the whitefly parasitoid *Eretmocerus eremicus* by the generalist predator *Geocoris punctipes*: A behavioral approach. *Plos One* **8**: e80679 (2013).
- 21 Polis GA, Myer CA and Holt RD, The ecology and evolution of intraguild predation: potencial competitors that eat each other. *Ann Rev Ecol Syst* **20**: 297-330 (1989).

- 22 Velasco-Hernández MC, Ramirez-Romero R, Sánchez-Hernández C, Biondi A, Muñoz-Urias A and Desneux N, Foraging behaviour of the parasitoid *Eretmocerus eremicus* under intraguild predation risk by *Macrolophus pygmaeus*. *Pest Manag Sci* **71**: 1346-1353 (2015).
- 23 Kareiva P and Sahakian R, Tritrophic effects of a simple architectural mutation in pea-plants. *Nature* **345**: 433-434 (1990).
- 24 Walter D and Odowd DJ, Leaf morphology and predators effect of leaf domatia on the abundance of predatory mites (Acaei, Phytoseiidae). *Environ Entomol* **21**: 478-484 (1992)
- 25 Desneux N and Ramirez-Romero R, Plant characteristics mediated by growing conditions can impact parasitoid's ability to attack host aphids in winter canola. *J Pest Sci* **82**: 335-342 (2009).
- 26 Malo S, Arnó J and Gabarra R, Intraguild interactions between the predator *Macrolophus pygmaeus* and the parasitoid *Eretmocerus mundus*, natural enemies of *Bemisia tabaci*. *Bio Sci Tech* **22**: 1059-1073 (2012).
- 27 Seelman L, Auer A, Hoffmann D, Schausberger P, Leaf pubescence mediates intraguild predation between predatory mites. *Oikos* **116**: 807-817 (2007).
- 28 Frechette B, Rojo S, Alomar O and Lucas E, Intraguild predation between syrphids and mirids: who is the prey? Who is the predator?. *Biocontrol* **52**: 175-191 (2007).
- 29 Polis GA and Holt RD, Intraguild predation the dynamics of complex trophic interactions. *Trends Ecol Evol* **7**: 151-154 (1992).
- 30 Finke DL and Denno RF, Intra-guild predation relaxes natural enemy impacts on herbivore populations. *Ecol Entomol* **28**: 67-73 (2003).
- 31 Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ and Jaffee A, Intraguild predation among biological-control agents: Theory and evidence. *Biol Control* **5**:303-335 (1995).
- 32 Colfer RG and Rosenheim JA, Predation on immature parasitoids and its impact on aphid suppression. *Oecologia* **126**: 292-304 (2001).
- 33 Janssen A, Monserrat M, Hillerislambers R, de Ross AM, Pallini A and Sabelis MW, Intraguild predation usually does not disrupt biological control,

- in *Trophic and Guild Interactions in Biological Control*, ed. by Brodeur J and Boivin G. Springer, Dordrecht, pp. 21-44 (2006).
- 34 Eubanks M and Denno R, Health food versus fast food: The effect of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* **25**: 140-146 (2000).
- 35 Asplen MK, Bellamy DE and Byrne DN, Eggs of *Eretmocerus eremicus*, a whitefly parasitoid. Department of Entomology, The University of Arizona, *Veg Report* pp 1-3.
- 36 Koss AM and Snyder WE, Alternative prey disrupt biocontrol by a guild of generalist predators. *Biol Control* **32**: 243-251 (2005).
- 37 Vink CJ, Thomas SM, Paquin P, Hatashi CY and Hedin M, The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebr Syst* **19**: 99-104 (2005).
- 38 Soler R and van Lenteren JC, Reproduction and development of *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Proc Neth Entomol Soc* **15**: 111-117 (2004).
- 39 Soto AG, Apablaza JH, Norero AS and Estay PP, Requerimientos térmicos de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) en tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Ciencia Inv Agr* **26**: 37-42 (1999).
- 40 Powell DA and Bellows TSJr, Development and reproduction of two populations of *Eretmocerus* species (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ Entomol* **21**: 651-658 (1992).
- 41 Cenis JL, Pérez P and Fereres A, Identification of aphids (Homoptera : Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann Entomol Soc Am* **86**: 545-550 (1993).
- 42 Moreno-Ripoll R, Agusti N, Berruezo R and Gabarra R, Trophic relationships between predators whiteflies and their parasitoids in tomato greenhouses: a molecular approach. *Bull Entomol Res* **102**: 415-423 (2012).
- 43 Crawley MJ, *The R Book*, Wiley, Silwood Park, UK, (2007).
- 44 Zar JH, *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey, USA (1998).
- 45 R Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2014).

- 46 Losos JB and Irschick DJ, The effect of perch diameter on escape behaviour of *Anolis* lizards: laboratory predictions and field tests. *Anim Behav* **51**: 593–602 (1996).
- 47 West SA, Flanagan KE and Godfray HCJ, The relationship between parasitoid size and fitness in the field, a study of *Achrysocharoides zwoelferi* (Hymenoptera: Eulophidae). *J Anim Ecol* **65**: 631–639 (1996).
- 48 Koss AM, Chang GC and Snyder WE, Predation of green peach aphids by generalist predators in the presence of alternative, Colorado potato beetle egg prey. *Biol Control* **31**: 237–244 (2004).
- 49 Gerling D, Orion T and Delarea Y, *Eretmocerus* penetration and immature development: A novel approach to overcome host immunity. *Arch Insect Biochem Physiol* **13**: 247–253 (1990).
- 50 Gerling D, Tremblay E and Orion T, Initial stages of the vital capsule formation in the *Eretmocerus-Bemisia tabaci* association. *REDIA* **74**: 411–415 (1991).
- 51 van Driesche R, Hoddle M and Center T, Control of Pests and Weeds by Natural Enemies, Blackwell Publishing, Malden, USA (2008).
- 52 Godfray HCJ, Parasitoids, Princeton University Press, New Jersey, USA (1994).
- 53 van Baaren J, Boivin G and Nénon JP, Intra- and interspecific host-discrimination in two closely related egg parasitoids. *Oecologia* **100**: 325–330 (1994).
- 54 Jervis MA and Kidd NAC, Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biol Rev* **61**: 395–434 (1986)
- 55 Tapia DH, Morales F and Grez AA, Olfactory cues mediating prey-searching behavior in interacting aphidophagous predators: are semiochemicals key factors in predator-facilitation?. *Entomol Exp Appl* **137**: 28–35 (2010).
- 56 Faraji F, Janssen A, Rijn PCJ and Sabelis MW, Kin recognition by the predatory mite *Iphiseius degenerans*: discrimination among own, conspecific, and heterospecific eggs. *Ecol Entomol* **25**: 147–155 (2000).

- 57 Argawala BK, Yasuda H and Kajita Y, Effect of conspecific and heterospecific feces on foraging and oviposition of two predatory ladybirds: role of fecal cues in predator avoidance. *J Chem Ecol* **29**: 357–376 (2003).
- 58 Nakashima Y, Birkett MA, Pye BJ, Pickett JA and Powell W, The role of semiochemicals in the avoidance of the seven-spot ladybird, *Coccinella septempunctata*, by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *J Chem Ecol* **30**: 1103–1116 (2004).
- 59 Sinclair ARE, Mduma S and Brashares JS, Patterns of predation in a diverse predator–prey system. *Nature* **425**: 288–290 (2003)
- 60 Englund G, Importance of spatial scale and prey movements in predator caging experiments. *Ecology* **78**: 2316–2325 (1997).
- 61 McCoy MW, Stier AC and Osenberg CW, Emergent effects of multiple predators on prey survival: the importance of depletion and the functional response. *Ecol Lett* **15**: 1449–1456 (2012).
- 62 Sura SA and Mahon HK, Effects of competition and predation on the feeding rate of the freshwater snail, *Helisomma trivolvis*. *Am Midl Nat* **166**: 358–368 (2011)
- 63 Moreno-Ripoll R, Gabarra R, Symondson WOC, King RA and Agustí N, Do the interactions among natural enemies compromise the biological control of the whitefly *Bemisia tabaci*?. *J Pest Sci* **87**:137–141(2014).

Figure Legends

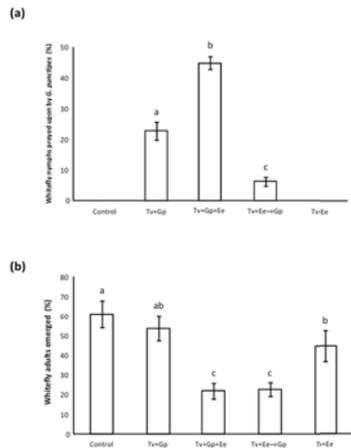


Figure 1. (a) Mean percentage (\pm SEM) of *T. vaporariorum* nymphs preyed upon by *Geocoris punctipes* under semi-field conditions, **(b)** Mean percentage (\pm SEM) of *T. vaporariorum* adults emerged. Analyzed treatments: control (*T. vaporariorum* nymphs only), Tv+Gp (*T. vaporariorum* nymphs and *G. punctipes*), Tv+Gp+Ee (*T. vaporariorum* nymphs, *G. punctipes* and *E. eremicus* released simultaneously), Tv+Ee=>Gp (*T. vaporariorum* nymphs, *E. eremicus*, and *G. punctipes* released consecutively), and Tv+Ee (*T. vaporariorum* nymphs and *E. eremicus*). Columns bearing different letters represent significant differences (at $P < 0.05$).

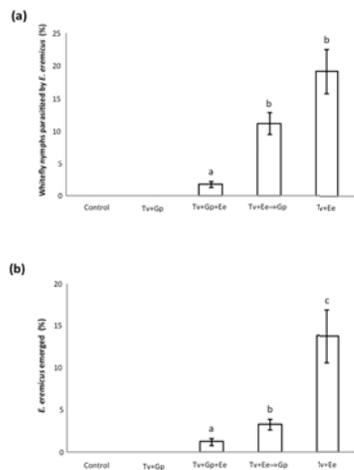


Figure 2. (a) Mean percentage (\pm SEM) of *T. vaporariorum* nymphs parasitized by *Eretmocerus eremicus* under semi-field conditions, (b) Mean percentage (\pm SEM) of *E. eremicus* adults emerged. Analyzed treatments: control (*T. vaporariorum* nymphs only), Tv+Gp (*T. vaporariorum* nymphs and *G. punctipes*), Tv+Gp+Ee (*T. vaporariorum* nymphs, *G. punctipes* and *E. eremicus* released simultaneously), Tv+Ee⇒Gp (*T. vaporariorum* nymphs, *E. eremicus* and *G. punctipes* released consecutively), and Tv+Ee (*T. vaporariorum* nymphs and *E. eremicus*). Columns bearing different letters represent significant differences (at $P < 0.05$)

Table 1. Molecular detection percentages of *T. vaporariorum* and *E. eremicus* in *G. punctipes*.

Treatment	Number of analyzed predators	Individuals in which DNA was detected (%)	
		<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Eretmocerus eremicus</i>
(Tv+Gp)	63	38.1	
(Tv+Gp+Ee)	58	55.2	89.7
(Tv+Ee=>Gp)	54	*	90.7

(Tv+Gp)= *T. vaporariorum* nymphs and *G. punctipes*; (Tv+Gp+Ee)= *T. vaporariorum* nymphs, *G. punctipes* and *E. eremicus* adults released simultaneously; (Tv+Ee=>Gp)= *T. vaporariorum* nymphs, *E. eremicus* and *G. punctipes* released consecutively. *At this time-point, predators were confronted only to parasitized whitefly nymphs.